



Središnja medicinska knjižnica

Bišćanin, Alen (2014) *Izraženost koneksina Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva [Connexin 43 expression paterns in adenomatous colonic polyps]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/2101>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alen Bišćanin

**Izraženost koneksina Cx43 u
adenomatoznim polipima debeloga
crijeva**

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alen Bišćanin

**Izraženost koneksina Cx43 u
adenomatoznim polipima debeloga
crijeva**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak” i Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice” u Zagrebu

Voditelji rada: prof. dr. sc. Neven Ljubičić i
doc. dr. sc. Drinko Baličević

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nevenu Ljubičiću i doc. dr. sc. Drinku Baličeviću, dvojici izuzetnih mentora, na korisnim savjetima i pomoći pri izradi ove disertacije.

Također sam zahvalan na velikoj pomoći djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i Zavoda za gastroenterologiju Kliničkog bolničkog centra “Sestre milosrdnice” u Zagrebu, koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem supruzi Mireli i svojim kćerima Miji i Evi, koji su vjerovali u mene i čija podrška i strpljivost nije nikad izostala.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Adenomatozni polipi debeloga crijeva.....	2
1.1.1. Etiologija adenomatoznih polipa.....	2
1.1.2. Patohistološka podjela polipa debeloga crijeva.....	2
1.1.3. Endoskopska podjela adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	5
1.1.4. Potencijal zloćudnih promjena adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	7
1.1.5. Adenom-karcinom sekvenca.....	8
1.1.6. Molekularna osnova karcinoma debeloga crijeva.....	9
1.1.6.1. Genska nestabilnost.....	10
1.1.6.1.1. Mutacija ili inaktivacija tumor supresor gena.....	10
1.1.6.1.2. Mutacija ili aktivacija onkogeni.....	11
1.1.6.2. Mikrosatelitska nestabilnost.....	12
1.1.6.3. Poremećaj čimbenika rasta.....	12
1.1.6.4. Poremećaj diferencijacije matičnih stanica.....	13
1.1.7. Uloga međustanične komunikacije u kolorektalnoj karcinogenezi.....	13
1.1.7.1. Pukotinasta spojišta.....	13
1.1.7.2. Koneksinski proteini.....	15
1.1.7.3. Koneksinima posredovana stanična smrt.....	17
1.1.7.4. Koneksin 43.....	19
1.1.8. Klinička slika adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	21
1.1.9. Dijagnostika adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	21
1.1.9.1. Test okultnog krvarenja.....	21
1.1.9.2. Irigografija.....	22
1.1.9.3. Endoskopski pregled debeloga crijeva.....	22
1.1.9.4. Kolonografija.....	23
1.1.9.5. Endoskopski pregled crijeva video kapsulom.....	23
1.1.9.6. Test karcinomske humane DNA u stolici.....	24
1.1.10. Liječenje adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	24
1.1.10.1. Endoskopska resekcija adenomatoznih polipa debeloga crijeva.....	25

1.1.10.2. Komplikacije resekcije adenomatoznih polipa debelog crijeva.....	26
1.1.10.3. Praćenje bolesnika nakon endoskopske resekcije adenomatoznih polipa debelog crijeva.....	26
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	28
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	29
3.1. Opći cilj.....	29
3.2. Specifični ciljevi.....	29
4. MATERIJALI I METODE	30
4.1. Ispitanici.....	30
4.2. Metode.....	32
4.3. Statistička analiza.....	33
5. REZULTATI.....	34
5.1. Usporedba pojedinih kliničkih i patoloških odrednica promatranih skupina ispitanika.....	34
5.2. Izraženost koneksina 43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva i nasuprotnoj zdravoj sluznici u promatranim skupinama ispitanika.....	44
5.3. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43.....	57
5.3.1. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva.....	57
5.3.2. Razlike u pojedinim kliničkim i patohistološkim odrednicama ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43 u zdravim sluznicama uzorkovanim nasuprot adenomatoznih polipa debelog crijeva	63
6. RASPRAVA.....	69
7. ZAKLJUČCI.....	77
8. SAŽETAK.....	79
9. SUMMARY.....	81
10. LITERATURA.....	82
11. ŽIVOTOPIS.....	99

POPIS OZNAKA I KRATICA

FAP - familijarna adenomatozna polipoza

NBI - metoda virtualne kromoendoskopije (od eng. „narrow band imaging“)

FICE - metoda virtualne kromoendoskopije (od eng. „FUJI Intelligent Chromo Endoscopy“)

I-scan - metoda virtualne kromoendoskopije (od eng. „intelligent-scan“)

RAS - obitelj staničnih signalnih molekula (od eng. „rat sarcoma“)

k-RAS - stanična signalna molekula (od eng. „Kirsten rat sarcoma“)

HNPCC - nasljedni nepolipozni karcinom kolona (od eng. „hereditary nonpolyposis colorectal cancer“)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (od eng. „deoxyribonucleic acid“)

p53 - stanična signalna molekula (od eng. „protein 53“)

p27 - stanična signalna molekula (od eng. „protein 27“)

DCC - gen koji nedostaje u karcinomu kolona (od eng. „deleted in colorectal carcinoma“)

SMAD - stanični signalni proteinski sustav (od eng. „Caenorhabditis elegans (Sma)“ i eng. „Drosophila mothers against dipeptidyl peptidase (Mad)“)

CIN - kromosomska nestabilnost (od eng. „chromosomal instability“)

MSI - mikrosatelitska nestabilnost (od eng. „microsatellite instability“)

APC - stanični protein, prijenosnik signala (od eng. „adenomatous polyposis coli“)

Wnt - stanični signalni put (od eng. „integration“ i eng. „wingless“)

TCF-LEF - grupa čimbenika prijenosa signala (od eng. „T cell factor-lymphocyte enhancer factor family“)

TGF - protein koji regulira stanični rast (od eng. „transforming growth factor“)

TGFBR2 - receptor za TGF protein (od eng. „TGF beta receptor II“)

TP53 - gen koji kodira staničnu signalnu molekulu, protein p53 (od eng. „tumor protein 53“)

G1- faza staničnog diobenog ciklusa (od eng. „gap 1“)

MAPK - enzim koji sudjeluje regulaciji staničnog dijeljenja (od eng. „mitogen-activated protein kinase“)

BRAF - stanična signalna molekula (od eng. „B - rapidly accelerated fibrosarcoma“)

MMR - geni zaduženi za kontrolu replikacije DNA (od eng. „mismatch repair“)

MLH1 - gen povezan s nastankom HNPCC (od eng. „mutL homolog 1“)

MSH1 - gen povezan s nastankom HNPCC (od eng. „mutS homolog 1“)

PMS - gen povezan s nastankom HNPCC (od eng. „postmeiotic segregation increased“)

RER - pojam za tumore s više mutacija (od eng. „replication error”)

COX-2 - enzim koji sudjeluje u metabolizmu prostaglandina (od eng. „cyclooxygenase-2“)

PGDH - prostaglandin dehidrogenaza

PI3K - enzim, sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa (od eng. „phosphoinositide 3-kinase”)

EGFR - stanični receptor koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa i imunosti (od eng. „epidermal growth factor receptor”)

EGF - protein koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa i imunosti (od eng. „epidermal growth factor”)

VEGF - faktor rasta, sudjeluje u angiogenezi (od eng. „vascular endothelial growth factor”)

v-Src - onkogen pronađen u Rousovom sarkomu, kodira tirozin kinazu

PKC - protein kinaza C, regulira funkciju drugih proteina fosforilacijom

Cdc2 - ciklin ovisna kinaza 2 (od eng. „cyclin-dependent kinase 2“)

Cip/Kip - obitelj proteinskih inhibitora ciklin-ovisne kinaze (od eng. „Cyclin Dependant Kinase interacting protein/Kinase inhibitory protein”)

ADH1 - alkoholna dehidrogenaza 1, sudjeluje u oksidacijskim procesima u stanici

cGMP - ciklički gvanozin monofosfat, sekundarni glasnik

cAMP - ciklički adenzin monofosfat, sekundarni glasnik

TGFb - protein koji sudjeluje u staničnom rastu (od eng. „transforming growth factor beta”)

JAK - Janus kinaza, protein interferenskog receptora s dva vezna mjesta (Janus, rimski bog s dva lica), primarno sudjeluje u regulaciji imunog odgovora leukocita

Stat - dio signalnog puta JAK/Stat u leukocitima koji sudjeluje u regulaciji imunskog odgovora (od eng. „signal transducer and activator of transcription”)

NAD - nikotin adenzin dinukleotid, koenzim, stanični prijenosnik elektrona

ATP - adenzin trifosfat, signalna, energetski bogata molekula (od eng. „adenosine triphosphate”)

Cx43 - koneksin 43

Cx29 - koneksin 29

1. UVOD

Proces kolorektalne karcinogeneze idealan je model za proučavanje procesa maligne preobrazbe, obzirom na dobro definirane stupnjeve u nastanku karcinoma, te relativno jednostavnu mogućnost kliničkog praćenja.

Karcinom debeloga crijeva je globalni javno-zdravstveni problem. Činjenica je da se starost svjetske populacije povećava, da većina zemalja u razvoju preuzima nezdrave zapadnjačke prehrambene navike, misleći pritom prvenstveno na konzumaciju takozvane brze hrane i smanjenu fizičku aktivnost, što dovodi do porasta broja pretilih. Sve navedeno dovodi postupno do povišenja incidencije kolorektalnog karcinoma u svijetu. U Hrvatskoj je zadnjih dvadeset godina, kao i u većini zemalja istočne Europe, prisutan trend porasta incidencije kolorektalnog karcinoma, pritom izraženiji kod muškaraca nego kod žena (1). Slično je i s trendom smrtnosti. Karcinom debeloga crijeva je drugi po učestalosti u ženskoj populaciji i treći u muškoj, dok je po smrtnosti na drugom mjestu u obje populacije (2).

Opće je prihvaćeno da najveći broj karcinoma debeloga crijeva nastaje iz adenomatoznih polipa, pa je važno težiti prevenciji raka debeloga crijeva kako promjenama životnih navika, tako i otkrivanjem i resekcijom adenoma debeloga crijeva. Upravo u ovoj fazi bolesti rezultati liječenja su najbolji, uz najmanje javno-zdravstvene troškove. Obzirom na veliki dio, osobito starije populacije, kod koje se može očekivati prisutnost polipa debeloga crijeva, od osobitog je interesa izdvojiti bolesnike s adenomima debeloga crijeva koji imaju visoki rizik nastanka karcinoma. Na taj bi se način smanjilo nepotrebno praćenje i kolonoskopiranje bolesnika, te pretraga učinila dostupnijom općoj populaciji. Iako je Hrvatska uz Finsku, Francusku, Italiju i Veliku Britaniju, jedna od tek pet europskih zemalja koja ima Nacionalni program prevencije raka debelog crijeva, on je pokrenut tek 2007. godine i još je prerano za konkretnije pomake u smislu smanjivanja učestalosti i smrtnosti raka debeloga crijeva. Pritom treba uzeti u obzir činjenicu da se manje od 20 % pacijenata uopće odazove probiru (3). Ovi programi, ali i smjernice probira za rak debeloga crijeva, u drugim europskim državama i Sjedinjenim američkim državama dovele su do značajnog pada učestalosti i smrtnosti od ove vrste raka (1). Također je više randomiziranih studija i jedna Cochranova analiza pokazalo smanjenje smrtnosti od raka debeloga crijeva u zemljama gdje se provodi probir za 16 % (4). Hrvatska je u europskim okvirima po učestalosti raka debeloga crijeva na devetom mjestu kod muškaraca i šesnaestom mjestu kod žena, a po smrtnost je u oba spola na četvrtom mjestu, što govori da mi otkrivamo rak debeloga crijeva u poodmakloj fazi.

1.1. Adenomatozni polipi debeloga crijeva

Polipi debeloga crijeva su izrasline koje se u većoj ili manjoj mjeri izbočuju u lumen crijeva. Najčešće sjelo polipa u gastrointestinalnom traktu je debelo crijevo, a njihova prevalencija kod populacije u dvadesetim i tridesetim godinama života je do 4 %, iza pedesete godine do 30 %, a u sedamdesetim godinama preko 50 % (5). Oko 2 / 3 polipa su adenomatozni, dakle imaju žarište displazije, a time i maligni potencijal (6). Osnovni značaj adenomatoznih polipa je što su to benigne neoplastične promjene, koje progresijom displazije, od niskog preko visokog stupnja, prelaze u karcinom. Adenomi su najčešće asimptomatski i otkrivaju se slučajno ili nakon pozitivnog nalaza okultnog krvarenja u stolici, obično u obradi anemije (7).

1.1.1. Etiologija polipa debeloga crijeva

U nastanku polipa debeloga crijeva bitan je utjecaj nasljeđa i vanjskih čimbenika, te njihova kombinacija. Utjecaj nasljeđa nalazimo u 15 - 20 % slučajeva, uz još oko 6 % dodatnog rizika koji nose uobičajene genetske varijacije u populaciji (8, 9). Od vanjskih čimbenika važnu ulogu imaju prekomjerna tjelesna težina, pušenje, fizička neaktivnost, prekomjerna konzumacija alkohola, te dijetetski čimbenici, kao što je prekomjeran unos masnoća i crvenog mesa, uz neadekvatan unos povrća (10). Utjecaj nasljeđa jasno je vidljiv kod familijarne adenomatozne polipoze (FAP)(11). Osim ovog sindroma, teško je definirati gensku osnovu povećanog rizika nastanka polipa zbog velikog utjecaja i interakcije okoline. Značajan rizik za nastanak polipa nosi kronična upala, npr. u ulceroznom kolitisu ili Crohnovoj bolesti, te izloženost zračenju (9).

1.1.2. Patohistološka podjela polipa debeloga crijeva

Polipe dijelimo na benigne neoplastične polipe, maligne neoplastične polipe, neneoplastične polipe i subepitelne polipoidne tumore (tablica 1). Adenomatozni polipi su premaligne promjene koje spadaju u epitelne tumore, a dalje ih prema tipu histologije dijelimo na tubularne i vilozne (kada je više od 80 % adenoma građeno od tubularnih ili viloznih, prstolikih formacija), odnosno tubulovilozne adenome (kada su adenomi podjednako građeni od tubularnih i prstolikih formacija)(12, 13)(slika 1). Od svih adenomatoznih polipa,

80 - 85 % čine tubularni adenomi, 3 - 16 % vilozni adenomi, te 8 - 16 % tubulovilozni adenomi (6). Svi adenomi imaju po definiciji izražen određeni stupanj displazije, a klasificiraju se uvijek prema navišem stupnju. Adenomatozni polipi se prema stupnju displazije dijele na adenome s displazijom niskog stupnja („low grade“), što uključuje ranije pojmove displazije niskog i srednjeg stupnja, a nalazi se u preko 80 % svih adenomatoznih polipa (6, 14), te na adenome s displazijom visokog stupnja („high grade“), što se odnosi na ranije pojmove displazije visokog stupnja i karcinoma „in situ“, a nalazi se u oko 10 % adenomatoznih polipa (15). Karcinom „in situ“ je naziv za žarište neoplastičnih stanica u adenomu koje ne probijaju bazalnu membranu, a ako žarište neoplastičnih stanica probija bazalnu membranu, ali ne i laminu propriju, radi se o intramukoznom karcinomu. Karcinom „in situ“ i intramukozni karcinom nemaju metastatski potencijal, pa se zajednički nazivaju neinvazivni karcinom. Maligni polip je onaj kod kojeg se neoplastične stanice probijaju ispod muskularis mukoze, a takav polip ima određeni metastatski potencijal i pripada skupini invazivnih karcinoma (5 - 7 % svih adenomatoznih polipa)(15, 16).

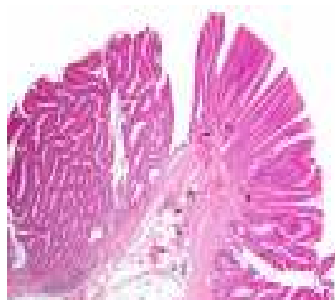
Posebna skupina premalignih epitelnih polipoidnih promjena su nazubljeni („serrated“) polipi koji čine oko 1 % svih polipa debelog crijeva (17). Danas je poznato da mogu izražavati elemente tubularne, odnosno vilozne transformacije, znakove atipije ili displazije (18). Nazubljeni polipi se dijele na hiperplastične polipe, tradicionalne nazubljene adenome i sesilne nazubljene adenome, a različit im je i put nastanka (13, 19). Sporadični sesilni nazubljeni adenomi u pravilu se nalaze u oralnom dijelu debelog crijeva. Tradicionalni nazubljeni adenomi imaju izgled sličniji klasičnim adenomatoznim polipima (pedukularni, s elementima displazije) i tipično se nalaze u distalnom kolonu. Prevalencija displazije visokog stupnja ili malignoma u nazubljenim adenomima je 5 - 16 %, što ostavlja otvorenim pitanje praćenja bolesnika s ovom vrstom polipa (19).

Tablica 1. Patohistološka podjela polipa debeloga crijeva (20)

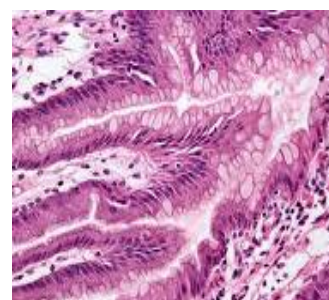
Benigni neoplastični polipi	Maligni neoplastični polipi	Ne-neoplastični polipi	Subepitelne tvorbe
<ul style="list-style-type: none"> - tubularni adenomi - tubulovilozni adenomi - vilozni adenomi - nazubljeni („serrated“) - adenomi 	<p>Neinvazivni karcinom</p> <ul style="list-style-type: none"> - karcinom „in situ“ - intramukozni karcinom <p>Invazivni karcinom</p> <ul style="list-style-type: none"> - maligni polip 	<ul style="list-style-type: none"> - hiperplastični - juvenilni - sluznični (mukozni) - Peutz - Jeghers - upalni 	<ul style="list-style-type: none"> - intestinalna pneumatoza - colitis cistica profunda - limfoidni polipi - lipomi - karcinoid - metastaze



A



B



C



D

Slika 1. Histološki tipovi adenomatoznih polipa i nazubljeni adenom (20)

(A) Tubularni adenom, (B) Tubulovilozni adenom, (C) Vilozni adenom, (D) Nazubljeni adenom.

1.1.3. Endoskopska podjela adenomatoznih polipa debeloga crijeva

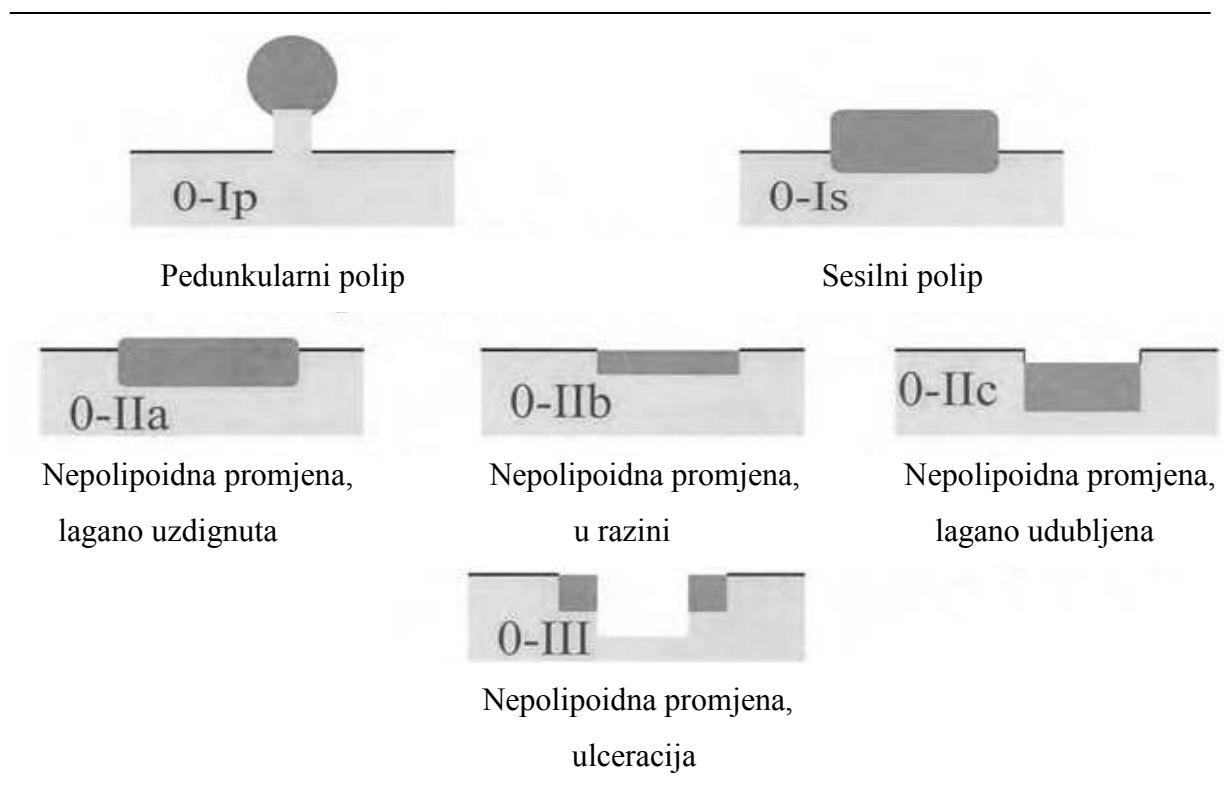
Obzirom na potrebu konzistentnijeg označavanja polipoidnih promjena u gastrointestinalnom sustavu, od 2000-te godine u uporabi je Pariška klasifikacija površinskih neoplastičnih promjena gastrointestinalnog sustava (21)(tablica 2)(slika 2). Adenomatozni polipi spadaju u površinske neoplastične promjene (tip 0). Ovisno o tome da li su, i koliko, iznad razine okolne zdrave sluznice, u razini ili ispod razine okolne sluznice, dijele se na tip 0-Ip (pedunkularni, na peteljci), tip 0-Is (sesilni, na širokoj bazi), te tip 0-2 i tip 0-3 (polipi u razini stijenke, „flat“ polipi) (slika 3 A - C)(tablica 2). Polipi tip 0-Is su oni kod kojih je visina manja od polovice promjera, tako da je većina adenoma u nastajanju u toj skupini.

Među adenomima tipa 0-Ip rjeđe nalazimo visoki stupanj displazije nego u ostalim adenomatoznim polipima iste veličine (16, 22). Praćenjem se u skupni bolesnika sa sesilnim i adenomima u razini stijenke češće ponovno nađu adenomatozni polipi. Udio adenoma koji su u razini stijenke crijeva u ukupnom broju adenoma je 8,5 do 12 % (23).

Upotrebom kromoendoskopije, te novijih metoda obrade slike ili virtualne kromoendoskopije, kao što su NBI („narrow band imaging“, Olympus), FICE („FUJI Intelligent Chromo Endoscopy“), te I-scan („intelligent-scan“, Pentax), zbog boljeg prikaza promjena u razini sluznice, taj se postotak može značajno povećati. Takvi su adenomi manji i češće sadrže displaziju visokog stupnja ili žarište karcinoma (23, 24).

Tablica 2. Pariška endoskopska klasifikacija površinskih neoplastičnih promjena (21)

TIP 0 (Površinske neoplastične promjene)				
Polipoidne promjene	Nepolipoidne promjene			
	Lagano uzdignute	U razini	Lagano udubljene	Ulkusi
0-I (Ip, Is)	0 – IIa	0 – IIb	0-IIc	0-III



Slika 2. Pariška endoskopska klasifikacija površinskih neoplastičnih promjena (21)

Prirodni tijek razvoja adenoma u razini stijenke crijeva nije u cijelosti poznat, a kako ne sadrže k-ras mutaciju nije nužno da tijekom progresije displastičnih promjena prolaze tipičnu polipoidnu fazu (25).



Slika 3. Endoskopska podjela adenomatoznih polipa debelog crijeva (20)

(A) Tip 0-Ip (pedunkulski polip), (B) Tip 0-Is (sesilni polip), (C) Tip 0-IIa („flat“ polip).

Veličinom adenome dijelimo u tri skupine: manje od 10 mm, od 10 do 20 mm, te veće od 20 mm (15, 20). Samo 13 - 16 % adenoma na obdukcijskim serijama je veće od 10 mm (25), dok se isti broj na endoskopskim i kirurškim serijama kreće od 26 do 40 % (15). Veći adenomi se češće nalaze u populacijama s višom incidencijom kolorektalnog karcinoma, kod starijih, te u distalnom crijevu (16, 26).

Polipi manji od 5 mm nazivaju se diminutivni. Ranije se smatralo da to nisu neoplastični polipi, ali danas znamo da se u diminutivnim polipima nalaze žarišta displazije u čak 30 do 50 % slučajeva (27, 28). U pravilu se nalaze distalno od lijeve fleksure debelog crijeva, rastu sporo i njihova klinička važnost nije velika. U diminutivnim polipima se rijetko nađu žarišta displazije visokog stupnja (do 4,4 %), a iznimno žarište invazivnog karcinoma (0,1 %)(28, 29). To u svakodnevnoj kliničkoj praksi znači da kod diminutivnih polipa nakon resekcije nije nužno uvijek inzistirati na patohistološkom nalazu, jer to ne utječe na prognozu i praćenje bolesnika (29). Njihova značajnost raste ako se nađu proksimalno od lijenalne fleksure gdje je znatno češći nalaz displazije visokog stupnja ili žarišta karcinoma (28). Klinička važnost je i u tome što se kod 29 % diminutivnih polipa u distalnom crijevu, nalaze adenomatozni polipi u proksimalnom dijelu crijeva (30). Tijekom vremena oni pokazuju iznimno spori rast (ako uopće i imaju tendenciju rasta), tako da se smatra da je rizik razvoja karcinoma crijeva u bolesnika s diminutivnim polipima isti kao onaj u općoj populaciji (28, 29).

Što se tiče raspodjele adenomatoznih polipa duž crijeva, u slijepom i uzlaznom debelom crijevu nalazi se 34 %, u poprečnom crijevu 26 %, u silaznom crijevu 10 %, u sigmoidnom crijevu 19 %, te u završnom crijevu 11 % adenoma (31). Ako se gledaju adenomi debelog crijeva veći od 1 cm, onda se nešto više adenoma nalazi u aboralnom crijevu, i to u silaznom crijevu 14 %, u sigmoidnom crijevu 16 %, te u rektumu 21 % adenoma (31).

1.1.4. Potencijal zloćudnih promjena adenomatoznih polipa debelog crijeva

Slijed adenom - karcinom je u procesu nastanka karcinoma debelog crijeva opetovano i nedvojbeno potvrđen (32). Oko 95 % karcinoma debelog crijeva nastaje iz adenomatoznih polipa (33). Vrijeme pretvorbe u karcinom je u prosjeku 7 godina, a može biti brže kod adenoma s visokim stupnjem displazije, te kod bolesnika s familijarnom adenomatoznom polipozom i hereditarnim nepolipoznim karcinomom kolona (HNPCC)(11,15, 20, 33).

Glavni čimbenici rizika za razvoj karcinoma u adenomatoznim polipima su veličina, visoki stupanj displazije i vilozni tip adenoma (34 - 37).

Kod adenoma većih od 10 mm potencijal maligne pretvorbe je tijekom praćenja i do četiri puta veći nego kod manjih od 10 mm (34)(tablica 3). Displazija visokog stupnja nalazi se u 10 - 12 % malih polipa, a znatno češće u srednje velikim i velikim polipima, gdje ju nalazimo u oko 30 % adenoma (37). Kod bolesnika s velikim adenomom debeloga crijeva, posebno ako je ujedno riječ i o multiplim adenomima viloznog tipa, vjerojatnost pojave metakronog karcinoma kolona je 6,6 puta veća nego u općoj populaciji (35). Pritom je vjerojatnost nepovoljnog događaja izravno ovisna o broju adenoma, te ako je broj veći od četiri, u razdoblju praćenja 3 - 5 godina iznosi 24 % (36, 38).

Tablica 3. Povezanost histološkog tipa, stupnja displazije i veličine adenomatoznog polipa s pojavom žarišta invazivnog karcinoma u polipu (15)

Adenomatozni polipi s prisutnim žarištem invazivnog karcinoma						
Veličina adenoma	Histološki tip adenoma			Stupanj displazije u adenomu		
	Tubularni	Tubulovilozni	Vilozni	Niski	Srednji	Visoki
(mm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0 - 9	1	4	10	0,3	2	27
10 - 19	10	7	10	3	14	24
> 20	35	46	53	42	50	48

1.1.5. Adenom-karcinom sekvenca

Više je direktnih i indirektnih dokaza da velika većina karcinoma debeloga crijeva nastaje iz adenomatoznih polipa. Epidemiološki se prati geografska podudarnost nalaza multiplih adenoma debeloga crijeva, adenoma viloznog tipa ili adenoma s prisutnom displazijom visokog stupnja s područjima visoke prevalencije karcinoma debeloga crijeva (39). Vremenski se može jasno pratiti usporedni porast prevalencije nastanka polipa i

karcinoma debeloga crijeva, time da nastanak kolorektalnog karcinoma prati vremenski odmak od 5 do 10 godina (15).

Klinički gledano, najočitiji dokaz adenom-karcinom sekvence je familijarna adenomatozna polipoza kolona. Kod pacijenta koji ima na stotine ili tisuće polipa, nastanak kolorektalnog karcinoma je neizbježan. Također se praćenjem populacije kojoj je učinjena endoskopska resekcija adenoma vidi značajan pad incidencije kolorektalnog karcinoma prema onoj očekivanoj u populaciji (1, 2, 4, 22).

Opće je poznato da se u adenomatoznim polipima debeloga crijeva često nađe žarište karcinoma, što je u normalnoj sluznici iznimno rijetko. Isto tako se uz tumorsko tkivo često vidi adenomatozno promjenjena sluznica (6, 15).

Dodatnu, možda i najjaču razinu dokaza adenom-karcinom sekvence pružaju molekularne i genetske studije. Višekratno je potvrđena i dodatno proširena hipoteza „multiplih pogodaka“ koju su još 1990. godine postavili Fearon i Vogelstein (12). Prema toj hipotezi za razvoj kolorektalnog karcinoma potreban je slijed od nekoliko mutacija. Radi se primarno o inaktivaciji tumor supresor gena ili aktivaciji onkogeni, te dodatno i drugim oblicima genske nestabilnosti.

1.1.6. Molekularna osnova karcinoma debeloga crijeva

Kolorektalni karcinom je među prvim karcinomima kod kojeg je DNA sekvencioniranjem otkriven kompletan genom. Somatske mutacije su otkrivene na 848 gena, od kojih se 140 pojavljuje u dva ili više karcinoma i najvjerojatnije su odgovorni za fenotipska obilježja karcinoma (40). Uglavnom se iste mutacije pojavljuju i u metastazama, što upućuje na to da nisu potrebne dodatne mutacije za tumorski rasap (41). Praćenjem mutacija zaključeno je kako je metastatski rasap brz, te se javlja unutar manje od 24 mjeseca od nastanka tumora (42). U četvrtom stupnju karcinoma prosječno se nalazi 15 mutacija karcinomskih gena, te još oko 60 rijetkih popratnih mutacija, što pokazuje kolika je genska heterogenost kolorektalnog karcinoma. To upućuje na važnost proučavanja puteva kojima geni djeluju, da bi se olakšalo naše shvaćanje nastanka tumora, te pronašle nove mogućnosti liječenja. Bitno je povezati znanje o genetskoj osnovi raka debeloga crijeva s prognozom i mogućim izborom terapije. Tako sporadični kolorektalni karcinom s poremećajem popravka DNA polimeraze („mismatch repair“) ima bolju prognozu (43, 44), a lošija prognoza povezana je s gubitkom p27 ili gubitkom heterozigotnosti kromosoma na poziciji 18q (45).

1.1.6.1. Genska nestabilnost

Danas su poznata dva glavna puta u nastanku adenoma kolona i nastanku kolorektalnog karcinoma. To su kanonski ili supresijski put (engl. «chromosomal instability pathway», CIN), te mikrosatelitska nestabilnost (MSI) ili mutacijski put (46).

1.1.6.1.1. Mutacija ili inaktivacija tumor supresor gena

Kanonski put nastaje uslijed kromosomske nestabilnosti i klasična je, opisana već od strane Fearona i Vogelsteina (12), adenom-karcinom sekvenca od 4 - 5 mutacija koja dovodi do aktivacije onkogeni ili inaktivacije tumor supresor gena (12, 22, 46). Podrazumjeva prisustvo adenoma kao prekursora kolorektalnog karcinoma. Prisutna je u 80 - 85 % karcinoma i najčešći je tip genske nestabilnosti karcinoma debelog crijeva. Uzrokuje mnoge promjene u broju i strukturi kromosoma (47). To je mehanizam kojim se gube kopije divljeg tipa tumor supresor gena, kao što su gubici alela na kromosomima 5q (APC), 17p (p53) i 18q (DCC/SMAD obitelj).

Gen APC (5q21) je označen kao ključan (eng. „gatekeeper“) u procesu kolorektalne onkogeneze, i njegova je mutacija najčešća (14). Može biti nasljedna, u sklopu FAP-a, ili stečena, a nalazi se u 60 - 82 % adenoma i kolorektalnih karcinoma (48). U odsutnosti funkcionalnog APC gena dolazi do poremećaja razgradnje beta katenina u Wnt signalnom putu, te njegove neadekvatne aktivacije, koaktivacije pojedinih gena u jezgri zaduženih za regulaciju staničnog ciklusa ili za tumorski rast (46). Aktivacija Wnt signalnog puta je jedna od promjena neophodnih za razvoj adenoma i dalje karcinoma. U tom procesu se onkoprotein beta-katenin veže za transkripcijske faktore u jezgri, TCF-LEF obitelj i regulira transkripciju gena uključenih u staničnu aktivaciju (32). Neovisno od Wnt signalnog puta, APC sudjeluje u regulaciji izgradnje i funkcije citoskeleta, te u mitozu (49). APC inaktivacija potiče tumorogenezu uslijed poremećaja u procesu stanične adhezije, neprepoznavanja kromosomske abnormalnosti, te dovodi do promjene stanične membrane uslijed smanjenja E-kadherina (50). Kod nosioca mutiranog APC gena vjerojatnost nastanka kolorektalnog karcinoma do 40-te godine je gotovo 100 % -tna (32). U malog broja bolesnika sličan učinak ima pojava mutiranog beta-katenina, rezistentnog na uobičajeni put razgradnje, što također dovodi do aktivacije Wnt signalnog puta.

Sljedeći događaj u kanonskom putu procesa karcinogeneze je mutacija tumor supresor gena lociranog na kromosomu 18q, što je ujedno povezano s lošom prognozom karcinoma

debeloga crijeva (51). Iako je u početku smatrano da je riječ o DCC genu, vjerojatnije je da je to SMAD4. On igra značajnu ulogu u razvoju karcinoma debeloga crijeva inaktivacijom TGF beta signalnog puta (46). U trećini kanonski nastalih karcinoma debeloga crijeva, te polovine karcinoma s „mismatch“ pogreškom, TGF-beta signalni put je onemogućen inaktivacijom domene TGFBR2 kinaze, ili češće mutacijama ili delecijama koje inaktiviraju daljnju kaskadu signalnoga puta, transkripcijske faktore SMAD 2-4 (12, 52). Ove se mutacije poklapaju vremenski s prijelazom adenoma u displaziju visokoga stupnja ili karcinom (53).

Tumor supresorski gen TP53 kodira protein p53 koji je „čuvar genoma“, a njegova mutacija je zadnji korak u kolorektalnoj kancerogenezi. Mutacija, odnosno gubitak ovog gena nalazi se u oko 50% ljudskih tumora (54). Gubitak TP53 je obično kombinacija mutacije koja inaktivira transkripcijsku aktivnost za p53, te delecije 17p kromosoma koja dovodi do nestanka drugog alela (54). Divlji tip p53 prepoznaje oštećenje DNA, zaustavlja dijeljenje stanice u G1 fazi i daje joj mogućnost reparacije greške, a u slučaju nesuspjeha dolazi do apoptoze (46, 49). Prema Fearonu i Vogelsteinu (12), mutacija TP53 koincidira sa prelaskom adenoma visokog stupnja displazije u karcinom (12). Abnormalnost proteina p53 nađena je u 4 - 26 % adenoma, 50 % adenoma sa žarištima karcinoma, te u 50 - 75 % kolorektalnih karcinoma (55, 56). U pojedinim slučajevima nastanka raka debeloga crijeva dolazi do atenuacije aktivnosti p53 proteina putem induktora apoptoze (32).

1.1.6.1.2. Mutacija ili aktivacija onkogeni

Onkogeni su oni geni koji sadržavaju strogo čuvane sekvence DNA, igraju značajnu ulogu u regulaciji staničnoga ciklusa, a njihovim poremećajem ili aktivacijom dolazi do poremećaja rasta stanice ili tumorskog rasta. Kod karcinoma debeloga crijeva najčešća je mutacija onkogeni koji aktiviraju signalni put mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK), a to su RAS geni, K, N i H (37 % karcinoma), te BRAF (13 % karcinoma)(40). RAS mutacija, uglavnom u K-RAS, nalazi se u srednjoj fazi adenomske progresije. BRAF mutacija aktivira signalne BRAF serin-treonin kinaze koji dalje utječu na MAPK signalnu kaskadu (57). BRAF mutacije se vide već i u malih polipa, a u usporedbi s RAS mutacijama, češće su u hiperplastičnih polipa, nazubljenih adenoma, te karcinoma proksimalnoga kolona (25). Pacijenti s brojnim i većim hiperplastičnim polipima imaju povećani rizik nastanka kolorektalnog karcinoma, a to se uglavnom događa preko nazubljenih adenoma kao medijatora (19).

1.1.6.2. Mikrosatelitska nestabilnost

U pojedinih pacijenata s kolorektalnim karcinomom dolazi do inaktivacije gena koji ispravljaju pogreške DNA polimeraze u mikrosatelitskim sekvencama („mismatch repair“ ili MMR geni)(46). Poznato je najmanje sedam gena MMR sustava: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 i hPMS2, a nalaze su u oko 15 - 20 % sporadičnih kolorektalnih karcinoma (58). Poremećaj može biti i nasljedan (HNPCC). Tumori s mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI tumori), koje zovemo još i RER+ tumorima (od eng. „Replication Error“), obilježava velika akumulacija mutacija u određenim kratkim (mikrosatelitskim) sekvencama koje se ponavljaju kroz genom (MSI-H, H od eng. „High“), a češće su 100 - 1 000 puta od razine mutacija u normalnim stanicama (46, 59). Epigenetske promjene (najčešće izazvane metilacijom) hMLH1 i hMSH2 najčešći su uzrok MMR mutacija u karcinomu debelog crijeva (60). Ove vrste karcinoma nemaju ili imaju tek sporadično mutacije koje su prisutne u kanonskom putu (61).

Osoba s mutacijom MLH1 i MSH2 nosi vjerojatnost nastanka kolorektalnog karcinoma oko 80 % do 45-te godine života. U ovih je bolesnika ubrzan i nastanak kolorektalnog raka, te se on može naći već oko 3 godine nakon urednog nalaza kolonoskopije (62,63). Novotvorine vezane uz ovaj genski poremećaj nastaju prvenstveno u oralnom crijevu, češće kod žena (63). Kod pronalaska ovog tumora veća je lokalna invazija, ali nižim ukupnim stadijem bolesti i rjeđe prisutnim udaljenim metastazama (63). Načelno su slabije diferencirani i češći u bolesnika mlađih od 55 godina i starijih od 70 godina (64).

Iako se smatralo da je ovo put nastanka nepolipoznog karcinoma kolona, sve je više dokaza da poremećaji MMR gena induciraju adenom-karcinom sekvencu, ali sa znatno kraćim vremenom pretvorbe od adenoma do karcinoma (65).

1.1.6.3. Poremećaj čimbenika rasta

U ranoj fazi nastanka adenoma bitan je poremećaj signalnog puta prostaglandina (66). Uzrok poremećaja može biti upala, poremećaj regulacije enzima COX-2 ili gubitak 15-prostaglandin dehidrogenaze (15-PGDH) i porast koncentracije prostaglandina E2 koji se dovodi u izravnu vezu s nastankom kolorektalnog karcinoma (67). Porast COX-2 se nalazi u 2 / 3, a gubitak 15-PGDH u oko 4 / 5 kolorektalnih karcinoma (68). To je put kojim nesteroidni protuupalni lijekovi preveniraju nastanak novih adenoma ili dovode do regresije već postojećih adenoma (69, 70).

Epidermalni čimbenik rasta ima značajnu ulogu u nastanku kolorektalnog karcinoma putem signalnih puteva MAPK i PI3K (41, 71). Istraživanja nisu pokazala odgovor uznapredovanih kolorektalnih karcinoma na anti-EGFR terapiju (72, 73).

Novije studije sugeriraju moguću ulogu vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Terapija s anti-VEGF protutijelima produljuje preživljenje kod kolorektalnog karcinoma za oko 30 % (74).

1.1.6.4. Poremećaj diferencijacije zametnih stanica

Zametne stanice imaju mogućnost samostalno se obnovljati (75). Nalaze se u normalnom epitelu kripti sluznice debelog crijeva, a njena daljnja diferencijacija je određena složenim stromalnim i epitelnim interakcijama. Takva se pojedinačna stanica, koja ima neoplastične promjene može uz određene uvjete smjestiti u pojedini organ, kao što je jetra, te na taj način nastane metastaza. Za sada nije moguće izolirati takvu stanicu, iako postoje neki markeri koji bi na to mogli upućivati, kao što su CD133, CD44, CD166 i ADH1. Teoretski bi se kontrolom diferencijacije matičnih stanica moglo utjecati na prevenciju i terapiju kolorektalnog karcinoma.

1.1.7. Uloga međustanične komunikacije u kolorektalnoj karcinogenezi

1.1.7.1. Pukotinasta spojišta

U onkogenezi su, osim ranije navedenih mehanizama, bitne međustanične interakcije posredovane propusnim vezama. Direktan kontakt stanice sa stanicom uključuje regulaciju životnog ciklusa stanice, a razmijenjeni sekundarni glasnici među stanicama moduliraju izraženost staničnih gena i funkciju proteina (76). Ključni međustanični komunikacijski kanali su pukotinasta spojišta (engl. Gap junction, GJ). Pukotinasta spojišta su 1967. godine otkrili Jean-Paul Revel i Morris Karnovsky, a smatra se da njihovo pojavljivanje u evoluciji koincidira s pojavom višestaničnih organizama (77)(slika 4). Pukotinasta spojišta su kanali na staničnim membranama promjera od 1,5 do 2 nm. Dozvoljavaju prolaz molekulama veličine do 1,2 kDa, molekule 1,2 do 2 kDa prolaze selektivno i otežano, a veće od 2 kDa (molekularne mase preko 1 000), kroz ovaj tip veze ne mogu proći. Na ovaj način stanice međusobno komuniciraju, usklađuju svoje funkcije, prvenstveno električnu i metaboličku

aktivnost, a na tkivnoj razini razvoj i diferencijaciju (77 - 83). Na taj način reguliraju i proces apoptoze, čime održavaju tkivnu homeostazu (84 - 86). GJ se nalaze u svim stanicama tkiva, osim onih koje inače funkcioniraju pojedinačno, kao što su eritrociti, neutrofili i neke zametne stanice.



Slika 4. Pukotinasto spojište između dva dendrita (D), na slici označeno strelicama (20)

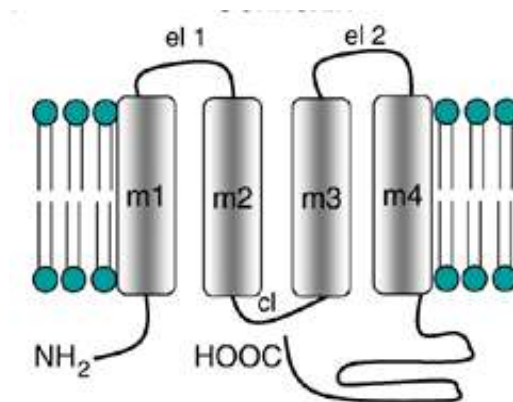
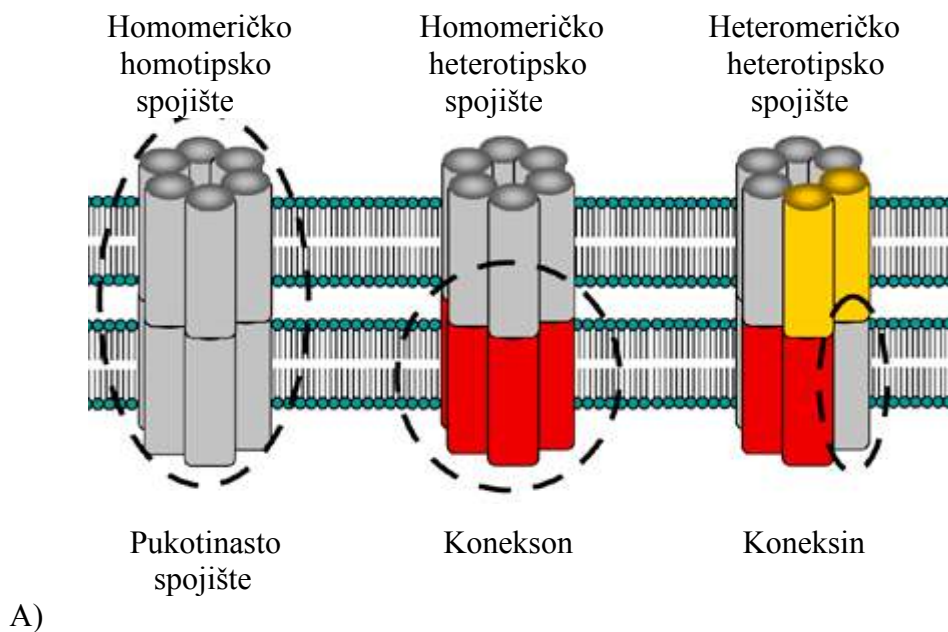
Svako pukotinasto spojište sastoji se od molekulskog kompleksa kojeg čine stotine kanala na membranama dviju susjednih stanica udaljenih oko 4 nm, na površini 1 μm^2 (87). Svaki pojedini kanal čine dvije podjedinice na susjednim stanicama, koje nazivamo koneksoni. Koneksoni su sastavljeni od 6 transmembranskih proteina, koneksina ili paneksina. Sam konekson može biti homomerički, sastavljen od jedne vrste koneksina, ili heteromerički, sastavljen od više vrsta koneksina. Kanali pukotinatog spojišta mogu biti homotipski, sastavljeni od dva ista homomerička koneksiona, ili heterotipski, sastavljeni od dva različita homomerička koneksiona, homomeričkog i heteromeričkog koneksiona ili od dva heteromerička koneksiona (78)(slika 5).

Kanali mogu biti otvoreni, zatvoreni ili u rezidualnom stanju. U pojedinim situacijama, reagirajući na podražaje koji pokazuju loše stanje stanice, kao što su poremećaj pH, koncentracije kalcija ili promjene potencijala među stanicama, mogu povećati svoju propusnost za određeni glasnik i preko stotinu puta. Kanali spojišta su većinu vremena u zatvorenom stanju, i kao takvi čuvaju cjelovitost stanice. Do zatvaranja kanala dolazi i kao odgovor na brojne fiziološke poticaje, kao što je ubrzano dijeljenje stanice uz povišenu razinu faktora kao što su PDGF i EGF, ili onkogeni kao v-Src, PKC i Cdc2 kinaza povezanih s mitozom (88).

1.1.7.2. Koneksinski proteini

Koneksinski proteini ili koneksini skupina su transmembranskih proteina koji tvore pukotinasta spojišta (90). Svaki koneksinski protein ima četiri transmembranske zavojnice (M1 - M4), koje imaju N-terminalni i karboksiterminalni kraj, visoko varijabilnu citoplazmatsku petlju (CL) i dvije strogo čuvane izvanstanične petlje, koje su čvrsto povezane disulfidnim vezama (EL 1 i EL 2)(91)(slika 5). Citoplazmatska c-terminalna domena kao „kugla na lancu” zatvara kanal ovisno o pH, transmembranskoj voltaži, razini izvanstaničnog ili citoplazmatskog kalcija, mehaničkoj stimulaciji, promjenama redoks potencijala, hipoksiji, nitrozilaciji koneksinskih proteina, razini inzulina ili ovisno o fosforilacijskom statusu (92 - 98). Na taj način je omogućen ulaz elektrolita (Na, Ca²⁺), ili bijeg esencijalnih staničnih metabolita kao što su NAD, ATP, glutamat, prostaglandini ili glutationi (99 - 101). Citoplazmatska C-terminalna domena istovremeno sadrži mnoštvo veznih mjesta za razne kinaze, potporne i signalne molekule (91).

Prosječna duljina koneksina je 380 aminokiselina, a relativna molekularna težina između 23 i 62 kDa, prema čemu se skraćeno i označavaju. Poluvrijeme života im je od 1 do 5 sati (102). Sinteza, zamjena i razgradnja koneksinskih proteina je kontinuirani dinamički proces, koji zahtjeva komplicirane regulatorne mehanizme, a samim time i otvara mogućnosti za intervencije unutar tog ciklusa. Koneksini prolaze kroz Golgijev aparat te se kasnije u procesu biosinteze oligomeriziraju (103). Usljed poremećaja transkripcije, koneksinski proteini često se mogu naći zarobljeni u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevim tjelešcima.



Slika 5. Shematski prikaz pukotinastog spojišta i koneksina (89)

(A) Membrane dviju susjednih stanica povezane pukotinastim spojištima, (B) Koneksin, koneksinski protein (m - transmembranska zavojnica, el - izvanstanična petlja, cl – citoplazmatska petlja).

Za integraciju koneksina u membranu bitna je funkcija kadherina. Koneksini se degradiraju formiranjem vezikula unutar stanice u koju ulaze dijelovi koneksona, koji se dalje razgrađuju proteosomalnim i lizosomalnim putem (102). Sastav i raspored unutar podjedinica propusne veze ključan je u određivanju funkcije kanala. Broj i struktura kanala se dugoročno mijenja ovisno o unutarnjim ili vanjskim homeostatskim čimbenicima.

Kod ljudi je poznato dvadeset različitih koneksinskih proteina (104). Do sada je kod

sisavaca opisano 14 gena koji kodiraju istoimene koneksine, među kojima je i koneksin 43 (Cx43). U *in vitro* pokusima je pokazano da stanice uglavnom sadrže mješavinu izraženosti više koneksina, što u slučaju mutacije umanjuje gubitak funkcije spojišta (105).

Kod bezkičmenjaka je pronađena druga skupina proteina koja tvori spojišta, ineksini, a njihovi ortolozi su kasnije pronađeni i kod kralježnjaka i nazvani paneksini (106). Kod čovjeka su nađene tri vrste pankesina: paneksin 1, paneksin 2 i panexin 3. Vjerojatno je da uz mogućnost stvaranja homomeričkih ili heteromeričkih koneksina, čine i kompetentna, funkcionalna pukotinasta spojišta, iako u tome postoje i neke kontroverze (107, 108). Načelno koneksini formirajući kanale spojišta omogućavaju međustanični transport i signalizaciju, dok paneksini imaju ključnu ulogu u parakrinoj regulaciji putem ATP-a. Koneksini dakle sudjeluju u primarnoj komunikaciji, a paneksini sekundarno pojačavaju signal. Izraženost koneksina u pojedinoj vrsti stanica, te njihov uticaj na stanični životni ciklus nije vidljiv samo kroz formiranje međustaničnih veza kao kanala kroz koje prolaze glasničke molekule, već je njihova uloga vjerojatno i posljedica uloge koneksina koja je nevezana za izgradnju spojišta (109 - 112). Mehanizam djelovanja još nije u potpunosti jasan, ali se čini da koneksini ili njihovi dijelovi ulaze u područje jezgre i djeluju direktno na transkripciju proteina ili na apoptotičke faktore (113, 114).

1.1.7.3. Koneksinima posredovana stanična smrt

Već su 1966. godine Lovwenstein i Kanno (115) dokazali da se kod neoplastičnih stanica gubi komunikacija s okolnim stanicama, te da je međustanična komunikacija važna za rast i diferencijaciju tkiva. Stanice se dijele i rastu u skladu s okolnim stanicama, uz međusobnu kontrolu, a gubitak takve interakcije, koju zovemo kontaktna inhibicija, smatra se jednim od najvažnijih koraka u onkogenezi (116). U kulturi tkiva množenje stanica prestaje kada se formira određeni sloj, dok u tkivima razmnožavanje prekida određena gustoća stanica. Prestanak rasta koji je određen procesom kontaktne inhibicije membranskim proteinima, kod ljudi je posredovan putem proteina p27 koji spada u Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) obitelj proteinskih inhibitora ciklin-ovisne kinaze, koju još čine proteini p21 i p57. Regulacija količine proteina p27 u stanici vrši se dijelom zbog utjecaja vanjskih faktora (npr. TGFb putem SMAD proteina ili IL2 putem Ras/MAPK, JAK/Stat i PI3-K/Akt signalnih modula), ali znatno više putem spojišta (117). Konačni učinak kontaktne inhibicije putem p27 ide aktivacijom patoloških putova tumor supresor gena, proteina p53 i RB1 (117).

Manjak izraženosti p27 u stanici povezan je s lošom prognozom pacijenata oboljelih od maligne bolesti (118).

Osim u kontaktnoj inhibiciji, važna je uloga koneksina i pukotinastnih spojišta u kontroli procesa apoptoze (85). Apoptoza se događa u svim tkivima kao dio normalnog staničnog ciklusa, a isto tako u mnogim patološkim stanjima, kao što je ishemijska stanična ozljeda, npr. nakon infarkta (119).

Danas postoje jasni dokazi povezanosti pukotinastnih spojišta i apoptoze (85). Indirektno je pokazano da kemijski inhibitori pukotinastnih spojišta, kao što su karbenoksolon i 18-beta-glicilretinička kiselina preveniraju apoptozu (120 - 122). Obrnuto gledano, tumorski promotori kao što su peroksisom proliferatori i fenobarbital, koji svojim djelovanjem prekidaju apoptozu, također inhibiraju spojišta (123). Zna se da je u više eksperimentalnih modela egzogena introdukcija koneksina facilitirala apoptotičku smrt stanice (85, 86, 122). Razni modeli demonstriraju obrasce širenja signala umiruće stanice na susjedne stanice, a taj se fenomen naziva „poljubac smrti“ (eng. „bystander death“ ili „kiss of death“)(122). Proučavanje te pojave vrlo je interesantno sa strane prevencije sekundarne ozljede, npr. u kontekstu moždane traume ili moždanog udara, ili liječenja malignih bolesti (eng. „suicide gene / prodrug therapy“)(124, 125).

U ranoj fazi apoptoze potrebna su pukotinasta spojišta, ali se progresijom stanične smrti morfološki mijenjaju i nestaju, što na kraju dovodi do odsutnosti veza među apoptotičnim stanicama (126). Smanjivanje broja spojišta ide paralelno s kaspaza 3 posredovanom degradacijom koneksina Cx43 (127). Promjena fosforilacijskog statusa je glavni mehanizam koji je za to odgovoran (128 - 130).

Postoje istraživanja koja pokazuju i da pukotinasta spojišta mogu prevenirati smrt stanice (131 - 134). Zdrave stanice mogu pomoći okolnim umirućim stanicama spasonosnim signalima, ili ugrožene stanice mogu oslabiti toksične substance odašiljući ih kroz spojišta susjednim zdravim stanicama (85, 131). Taj događaj, kada se preživljenje stanice pomaže signalima iz okoline nazvan je fenomenom „dobrog Samaritanca“ („poljubac života“ ili eng. „kiss of life“). Signali koje razmjenjuju stanice u ranoj apoptozi i okolne neapoptotične stanice zavisno od stanja stanice koja prima signale i uvjeta u okolini može završiti smrću ili preživljenjem stanice (85, 135).

Malo se zna o signalnim molekulama koje su odgovorne za staničnu smrt. Kao glavni signal za promociju stanične smrti i apoptoze predložen je model za koji je odgovoran kalcij, iako je njegova uloga limitirana interakcijama sa slabije pokretnim proteinima (124, 135 - 137). IP3 je zato bolji kandidat pošto lakše prolazi kroz spojišta (138). Noviji radovi

pokazuju da će smrt stanice ili njezino preživljenje ovisiti o stabilnosti koncentracije kalcija: promjenjive vrijednosti znače preživljenje, a postojeće vrijednosti smrt stanice (139). Drugi mogući glasnici smrti su cAMP i cGMP (140). Što se tiče molekula koje šire spasonosne signale (eng. „rescue messengers”), to bi mogle biti energijom bogate molekule glukoze i ATP, ili skupljači slobodnih radikala kao što je askorbinska kiselina ili reducirani glutathion (83, 85).

1.1.7.4. Koneksin 43

Koneksin 43 (Cx43) član je porodice koneksinskih proteina kojeg kodira humani gen GJA1 mapiran na 6. kromosomu (102). Molekulska težina mu je 43 036 Da i najzastupljeniji je član obitelji u propusnim vezama. Nalazi se u preko 30 tkiva i preko 45 staničnih linija, te predstavlja najpromjenjiviji od svih poznatih koneksina kod velikog broja tumora (104). Cx43 je fosfoprotein, pa je fosforilacija ključna za njegovu aktivaciju i ugradnju u pukotinasta spojišta (128, 130, 141).

Cx43 je gastrointestinalnom traktu zastupljen u gotovo svim sluzničkim slojevima, tvoreći propusne veze među raznim vrstama stanica koje čine pojedine slojeve crijeva (142, 143). Jedini sloj koji nije pokazivao imunohistokemijsku reaktivnost na Cx43 je longitudinalni mišićni sloj. Osim uobičajenih uloga koje imaju u svim stanicama, u crijevu je bitna i kontrola motiliteta (142).

Izraženosti i aktivnost Cx43 mogu ovisiti o pojedinim sastojcima hrane, kao što su npr. katehini zelenog čaja ili selen, te ekstrakti duhanskog dima i upala, što je osobito značajno s aspekta kolorektalne kancerogeneze (144 - 147).

Gubitak koneksina Cx43 nespojiv je sa životom, te dovodi do smrti u embrionalnom ili neonatalnom razdoblju (148). Autosomno recesivna mutacija Cx43 dovodi do okulodentalne displazije, koja se očituje manjim očima, nerazvijenim zubima, sindaktilijom, atroseptalnim defektom i aritmijama (149). Interesantno je da se radi o ubikvitarnom koneksinu koji sudjeluje u diferencijaciji tkiva, a da su oboljeli od okulodentalne displazije u osnovi manje bolesni nego što bismo očekivali (104).

Poremećaj izraženosti Cx43 promjenom morfoloških ili funkcionalnih osobina stanica i tkiva, promjenom transkripcije, mutacijom ili aktivacijom citokinskih kaskada proteina staničnog ciklusa, može dovesti do nastanka neoplazmi (150, 151). Mutacija Cx43 u tumorima se nalazi vrlo rijetko (143). Restauracija Cx43 u stanicama malignih tumora može usporiti rast tumora, te poboljšati njegovu diferencijaciju, dok se obrnuto događa kod

smanjivanja njegove aktivnosti (152 - 156). Poznato je da je izraženost Cx43 manja u nekim vrstama tumorskih stanica u odnosu na stanice iz kojih je tumor potekao (stanice zdravog epitela). Primjer su karcinom dojke, karcinom pluća, jajnika, neuroblastom i kolorektalni karcinom (157 - 160). Pritom je utjecaj na tumorski rast ili tumorska supresija specifična za koneksin i određenu vrstu tkiva (143).

Promjena izraženosti Cx43 na staničnoj membrani ili njegovo nakupljanje u jezgri ili citoplazmi važna je u procesu metastaziranja tumora (80, 161). Da bi tumorska stanica hematogeno metastazirala, potrebno je da dijapedezom prođe kroz endotel krvne žile, putuje cirkulacijom, te se ponovno vrati u vezivno tkivo koje okružuje krvnu žilu. U novoj okolini mora se povezati na određeni način s okolnim stanicama, te početi iskorištavati zdravi okoliš za svoje daljnje napredovanje (80, 162 - 164). Maligne stanice koje međusobno ne komuniciraju propusnim vezama, iste takve veze formiraju s okolnim zdravim stanicama, što upućuje na zaključak da je to mehanizam koji omogućuje razvoj metastaza (128, 129, 143).

Cx43 se uglavnom, pa tako i u karcinomu debeloga crijeva javlja kao tumor-supresor kroz održavanje normalnih funkcionalnih veza među stanicama (150, 165 - 167). Isto tako je moguće da u nekim tumorima pogoduje nastanku i progresiji tumora (168). To bi mogla biti posljedica istovremenog poremećaja izraženosti pro- i protuapoptotičkih gena u nekim stanicama kod poremećaja funkcije pukotinastih spojišta (169).

Važnost Cx43 u adeomatoznim polipima i kolorektalnoj karcinogenezi je utoliko veća kada se zna da Wnt signalni put i beta katenin pojačavaju transkripciju koneksina, a Cx43 ima mogućnost povratne regulacije beta katenina (150, 170, 171). Cx43 pritom negativno regulira Wnt signalni put (84, 166, 173).

Ono što je intrigantno u svim istraživanjima, je zaključiti da li je promjena izraženosti koneksina i međustanične komunikacije u procesu kancerogeneze njegov uzrok ili posljedica (172). Također je bitno tu promjenu gledati u odnosu na okruženje u kome se nalazi (171, 173), te u kakvom je odnosu izraženost u zdravom tkivu prema izraženosti u neoplazmama (174 - 176). To je ujedno podatak koji najviše intrigira i potiče daljnja istraživanja o ulozi koneksina u procesu kancerogeneze.

Prognostička vrijednost Cx43 proučavana je na mnogim tumorima (178 - 182), pa tako i u karcinomu debeloga crijeva (150, 166, 180). Iako se Cx43 načelno ponaša kao tumor supresor, i njegov gubitak znači lošiju prognozu karcinoma debeloga crijeva (166, 179), njegovu prognostičku ulogu treba i dalje istraživati, kako u karcinomu, tako i u potencijalu malignih promjena adenoma, koji sam po sebi nije visok (182).

1.1.8. Klinička slika adenomatoznih polipa debeloga crijeva

Adenomi debelog crijeva su daleko najčešće asimptomatski (14). Veliki adenomi mogu okultno ili vidljivo krvariti, zbog čega dovedu do pozitivnog nalaza okultnog krvarenja iz stolice, odnosno do sideropenije i moguće posljedične anemije. To je češće kod polipa u distalnom dijelu crijeva (4). Iznimno zbog svoje veličine mogu izazvati smetnje pasaže.

1.1.9. Dijagnostika adenomatoznih polipa debeloga crijeva

Izostanak jasne kliničke slike dodatno naglašava potrebu za aktivnim stavom u dijagnostici polipa, a ovisno o dobi bolesnika i obiteljskoj anamnezi, to mogu biti testovi stolice na okultno krvarenje ili mutiranu DNA, odnosno druge neinvazivne ili invazivne dijagnostičke metode. Osnovni dugoročni cilj je pritom prevencija karcinoma debeloga crijeva.

1.1.9.1. Test okultnog krvarenja

Test okultnog krvarenja je sam za sebe dosta neosjetljiva i nespecifična metoda probira za adenome, pa i karcinome debeloga crijeva, osobito u populaciji visokog rizika, jer adenomi manji od 10 mm ne krvare. Test je pozitivan u oko 3 % asimptomatskih osoba iznad 40-te godine života (183). Manje od 40 % bolesnika s adenomima debeloga crijeva ima pozitivan test okultnog krvarenja (14, 184). Gvajak test okultnog krvarenja ima pozitivnu prediktivnu vrijednost za neoplazme kolona između 30 i 35 % (185). To znači da se gotovo tri četvrtine svih polipa ovim testom previdi. Posljedica je to i dijelom lažno pozitivnog testa kod pacijenata koji su kratko pred provođenje testa konzumirali svježije crveno meso ili povrće bogato peroksidazom te lažno negativnog testa kod pacijenata s većim unosom antioksidansa. Zbog toga su razvijeni imunološki testovi koji se oslanjaju na prepoznavanje ljudskog hemoglobina u stolici. Oni predstavljaju poboljšanje u odnosu na gvajak test, ali i dalje otkrivaju samo 30 - 60 % svih neoplazmi kolona (186). Što se tiče adenoma, nema značajne razlike, te se otkriva njih 25 - 27 % (187).

1.1.9.2. Irigografija

Irigografija je kao metoda probira za adenome, a i kolorektalni karcinom, davno napuštena, uzimajući u obzir slabe rezultate. Dijagnostička osjetljivost irigografije u otkrivanju polipa manjih od 6 mm bila je 32 %, polipa veličine 6 - 10 mm 53 %, a polipa većih od 10 mm svega 48 % (16).

1.1.9.3. Endoskopski pregled debeloga crijeva

Endoskopskim pregledom debeloga crijeva do lijeve fleksure (sigmoidoskopija), u oko 15 % asptomatskih osoba iznad 40-te godine života se nađu adenomi (188), a u osoba od 55 do 64 godine kod njih 0,3 % se nalazi karcinom (189). Preventivnom sigmoidoskopijom smanjuje se pojava neoplazmi debeloga crijeva za 60 - 75 % (188). Pritom je značajno da se u oko 30 % karcinoma nađe sinkroni adenom (15), što u svakom slučaju daje prednost kompletnom endoskopskom pregledu crijeva, kolonoskopiji (189). Pritom je taj nedostatak metode posebno izražen kod starijih bolesnika, onih s pozitivnom anamnezom kolorektalnog karcinoma, te kod muškaraca (9, 190, 191).

Endoskopski pregled debeloga crijeva u cijelosti (totalna kolonoskopija) u dijagnostici adenoma i karcinoma debeloga crijeva superiornija je drugim metodama, a ujedno je i terapijska metoda (192, 193). Istodobno je kolonoskopija glavna metoda probira kolorektalnog karcinoma (193). Glavni nedostaci metode su invazivnost i tehnička nemogućnost dosizanja cekuma u 5 do 10 % pacijenata. Uvijek postoji i mogućnost previda adenoma zbog haustracije i zavoja crijeva, te slabe pripreme za zahvat. Prema recentnim studijama previdi adenoma koji su manji od 10 mm iznosi 15 - 27 %, dok se u slučajevima kada je adenom veći od 10 mm, previd može dogoditi u do 13 % slučajeva (194). Obzirom na dosta visok postotak previda adenomatoznih polipa, osim adekvatne pripreme i sedacije bolesnika, danas se inzistira na adekvatnoj edukaciji operatera te pregledu crijeva kod izvlačenja aparata („withdrawal time”), u trajanju ne kraćem od 6 minuta. To smanjuje mogućnost pogreške za više od 50 % (195).

Rizik ozbiljnih komplikacija nakon kolonoskopije je nizak. U pregledu 12 studija s 57 742 dijagnostičkih kolonoskopija, ozbiljne komplikacije dogodile su se u 0,28 % slučajeva (196). Više od 85 % komplikacija dogodilo se kod resekcije adenoma. U jednoj drugoj studiji koja je koristila bazu s 2,3 milijuna kolonoskopija, sveukupna stopa komplikacija koje su rezultirale hospitalizacijom bila je 1,98 ‰ (197).

1.1.9.4. Kolonografija

CT kolonografija je danas najbrže rastuća metoda u probiru crijevnih adenoma i karcinoma. Sama metoda može se nakon pripreme crijeva kao za kolonoskopiju izvoditi klasično s insuflacijom CO₂ i snimanjem ili se može dati peroralni kontrast, što po nekima povećava mogućnost razlikovanja polipa od rezidua stolice (198). Prednost ove metode je neinvazivnost, dok se uvijek treba uzeti u obzir ozračivanje bolesnika (ili zdravoga kada je riječ o probiru), koje nosi rizik nastanka karcinoma do 50-te godine života oko 0,14 % (193). Pouzdanost metode je više nego drugdje ovisna o iskustvu operatera, a naravno i o tehničkim značajkama CT aparata. Obzirom na enormnu razinu zračenja, danas se u pregledu crijeva umjesto CT-a sve više koristi pregled magnetskom rezonancom, kod koje zračenja nema (199). MR se zasad najčešće koristi u Crohnovoj bolesti za analizu tankoga crijeva, ali isto tako sve češće i za pregled debeloga crijeva.

Kada CT kolonografiju uspoređujemo s kolonoskopijom, mali, srednje veliki ili veliki adenomi se detektiraju u 29 naprema 59 %, 47 naprema 82 % i 63 naprema 92 % slučajeva. Osjetljivost CT-a je nešto viša u populaciji s niskom prevalencijom kolorektalnih karcinoma (200). Općenito gledajući, multicentrične studije pokazuju osjetljivost za male adenome oko 78 %, a za srednje velike i velike adenome oko 90 % (200). Što se tiče adenoma manjih od 5 mm, u studijama je osjetljivost CT kolonografije izrazito niska, a dobar dio radiologa ih ne opisuje niti kada ih vidi.

Kod CT kolonografije se u oko 70 % slučajeva nađe nusnalaz u zdjelici ili trbuhu koji uzrokuje dodatnu obradu i troškove, te izaziva dodatnu zabrinutost pacijenata. Samo oko 11 % ovih bolesnika ima klinički značajan nalaz (193).

1.1.9.5. Endoskopski pregled crijeva video kapsulom

Video kapsula je posebno konstruirani aparat oblika kapsule, veličine manje od 1 cm, koji u sebi sadrži malu kameru, izvor svjetla, odašiljač i bateriju. Prilikom prolaska kroz crijevo slika isječke sluznice crijeva, te ih odašilje u vanjsku jedinicu, gdje se pohranjuju, te se mogu dalje pregledavati i analizirati. Kamera je izvrsna za dijagnostiku tankoga crijeva, dok se kolon-kapsule tek razvijaju. Veliki nedostatak im je što zahtjevaju izvrsnu pripremu crijeva, te cijena. U budućnosti se planira razvoj kapsula koje bi imale vlastiti pogon, te mogućnost uzimanja uzoraka tkiva. Za adenome bilo koje veličine osjetljivost je 71 %

(61 - 76 %), a specifičnost 75 % (66 - 83 %). Kod bolesnika koji imaju adenom veći od 6 mm, ili tri ili više adenoma osjetljivost je 68 % (56 - 79 %), a specifičnost 82 % (77 - 85 %)(201).

1.1.9.6. Test karcinomske humane DNA u stolici

Test izmjenjene humane DNA u stolici razvija se kao neinvazivna metoda detekcije tumora, zasnovana na dosadašnjim saznanjima o kolorektalnoj karcinogenezi. Usavršavanjem metode, osjetljivost za karcinom je narasla na preko 80 %, dok je za adenome, primarno one preko 10 mm, još uvijek relativno niska i iznosi nešto preko 40 % (202, 203). Specifičnost metode je 95 % (202). Za očekivati je da će ova metoda daljnjim usavršavanjem postati dodatno osjetljivija, te jeftinija i prihvatljiva za svakodnevnu uporabu.

1.1.10. Liječenje adenomatoznih polipa debelog crijeva

Podaci o brzini rasta adenoma i pretvorbi u karcinom su dosta šaroliki i uglavnom se tijekom vremena očekuje progresija njihove veličine. Smatra se da je brzina rasta i vrijeme udvostručenja veličine adenoma slično kao i kod karcinoma te da je uglavnom potrebno razdoblje dulje od šest mjeseci (14). Za adenom manji od 5 mm potrebno je oko 3 godine da dosegne veličinu od 10 mm (14, 16). Populacijske studije su pokazale da je prosječna dob bolesnika s adenomatoznim polipima 4 - 5 godina niža od prosječne dobi bolesnika s dijagnosticiranim kolorektalnim karcinomom (15, 16). Slično je primjećeno kod bolesnika sa obiteljskom polipozom (FAP), gdje je razlika u dobi bila oko 12 godina (15). Kod bolesnika s nereseciranim adenomima, Muto i sur. (15) su pokazali da je potrebno minimalno pet godina za progresiju adenoma u karcinom, ali i da je to vrijeme uglavnom dulje od deset godina. Naravno da je to vrijeme bilo kraće što je adenom bio veći ili je imao viši stupanj displazije, ako je bio viloznog tipa ili možda već sadržao žarište karcinoma. Kozuka i sur. (204) su pokazali da je prosječno vrijeme pretvorbe adenoma s niskim stupnjem displazije u karcinom iznosilo oko 8 godina, dok je kod adenoma s visokim stupnjem displazije vremenski slijed iznosio prosječno oko 3,6 godina (204). Očekivani kumulativni rizik nastanka karcinoma u adenomatoznom polipu je nakon 5 godina 2,5 %, nakon 10 godina 8 % te nakon 20 godina 24 % (205). Interesantni su rezultati Bersentesa i sur. (206), koji su pratili bolesnike s 30 rektosigmoidnih tubularnih adenoma. Tijekom dvije godine nisu našli znakove regresije veličine polipa, dok ih je samo 10 % pokazalo ubrzani rast. Knoerochild i sur. (207) su

analizirali 213 adenoma, te je nakon serijskog praćenja tijekom 3 - 5 godina pokazano da je samo 4 % adenoma (veličine do 15 mm) raslo, dok su ostali adenomi ostali veličinom nepromjenjeni, smanjili se ili čak nestali. Pritom se čini da regresiju veličine pokazuju uglavnom mali adenomi, veličine do 10 mm (207).

1.1.10.1. Endoskopska resekcija adenomatoznih polipa debelog crijeva

Svaki dijagnosticiran adenomatozni polip, s kliničkog stajališta, treba resecirati („polipi se ne bioptiraju, već reseciraju!”).

Primarno, terapijski pristup resekciji adenomatoznih polipa je endoskopski, a postoje mnoge tehnike resekcije (208). U svakodnevnoj primjeni za manje adenome se koristi mehanička resekcija polipektomijskom omčom (eng. „cold snare excision”). Kod većih adenoma koristi se elektroresekcija polipektomijskom omčom, s odizanjem fiziološkm otopinom, uz eventualno dodatak adrenalina, za polipe veće od 10 - 15 mm (slika 6). Kod velikih adenoma se može raditi resekcija u dijelovima (“peacemeal”), a rubovi se dodatno mogu termokoagulirati. Termokoagulacija se koristi i kod malih adenoma, a pritom treba imati na umu da nakon koagulacije adenoma nema materijala za histološku analizu.

Veliki adenomi se osim u dijelovima mogu odstranjivati i metodama endomukozne resekcije ili submukozne disekcije, koje su tehnički dosta zahtjevne i nose veći rizik komplikacija (209). Ako se adenom ne uspije odstraniti u jednom aktu, procedura se ponavlja, a ako se nakon 2 - 3 procedure ne odstrani u cijelosti, indicirano je kirurško liječenje.



Slika 6. (A) - (D) Endoskopska resekcija adenomatoznog polipa debelog crijeva (208)

(A) Adenomatozni polip, (B) Odizanje polipa fiziološkom otopinom, (C) Zaomčavanje adenoma polipektomijskom omčom, (D) Mjesto resekcije

Kod adenoma tipa 0-Is, 0-IIa ili 0-IIb, granica prema zdravoj sluznici se može bolje markirati koristeći pri endoskopiji posebne boje za bolju demarkaciju, odnosno kromoendoskopiju. U debelom crijevu za bojenje se koristi indigo karmin, a boja se posebnim kateterom poput spreja raspršuje po sluznici, naglašavajući teksturu adenoma, odnosno zdrave sluznice. Kao što smo ranije spomenuli, danas je u upotrebi i takozvana virtualna kromoendoskopija. Koriste se posebni modaliteti rada endoskopa, koji mijenjaju spektar izvora svjetla endoskopa, kao što je Olympusov NBI sustav, ili vrše doradu slike, kao što je Pentaxov i-scan ili Fujinonov FICE sustav. Na ovaj način uz značajno poboljšanu rezoluciju slike ekrana, omogućuju puno bolju vizualizaciju neoplastičnih promjena sluznice gastrointestinalnog trakta.

1.1.10.2. Komplikacije resekcije adenomatoznih polipa debelog crijeva

Najčešće ozbiljne komplikacije endoskopske resekcije su krvarenje, postpolipektomijski sindrom, perforacija crijeva, te infekcije (209-211). Moguće su također komplikacije vezane za sedaciju bolesnika ili čišćenje crijeva. Krvarenje se javlja u oko 1 - 2 % endoskopskih resekcija, a može se javiti odmah ili odloženo, najčešće nakon 5 - 7 dana. Rješava se uglavnom endoskopski postavljanjem hemostatske kopče, a vrlo rijetko je potrebna kirurška intervencija. Perforacija se javlja u 0,01 - 0,1 % svih kolonoskopija, naravno znatno češće kod intervencija, nego kod dijagnostičkih procedura (211). Kod endomukoznih resekcija i submukoznih disekcija broj perforacija je znatno viši i kreće se do 10 % (212). Postpolipektomijski sindrom (eng. „Colon Coagulation Syndrome”) javlja se kao posljedica termičke ozljede dubljih slojeva stijenke crijeva s nadražajem seroze i posljedičnom okolnom upalom reakcijom. Javlja se uglavnom kod resekcije preko 2 cm velikih adenoma, osobito tipa 0-Is, u 0,14 - 0,5 % procedura (209, 211).

1.1.10.3. Praćenje bolesnika nakon endoskopske resekcije adenomatoznih polipa debelog crijeva

Obzirom na brojnost bolesnika kod kojih je učinjena endoskopska resekcija adenoma, potencijalnog rizika razvoja kolorektalnog karcinoma, te nedovoljno razvijene neinvazivne metode dijagnostike adenoma debelog crijeva, vrlo je važno definirati smjernice postpolipektomijskog praćenja. Osnova za određivanje perioda praćenja kod adenomatoznih

polipa su kombinacija veličine i broja polipa, histološkog tipa, te stupnja displazije u adenomu (tablica 4), dok se polipozni sindromi prate po zasebnim kriterijima.

Kod endoskopske resekcije adenoma visokog stupnja displazije bez jasne rezne plohe, preporučuje se ponavljanje kolonoskopije kroz 6 mjeseci, a kod malignog polipa ili adenoma sa žarištem intramukoznog karcinoma za 3 do 6 mjeseci (20).

Tablica 4. Preporuke praćenja osoba prosječnog rizika po resekciji adenoma ili po inicijalnoj kolonoskopiji prema US Multisociety Task Force on Colorectal Cancer (213)

Prva kolonoskopija : najznačajniji nalaz	Preporučeni period praćenja (godine)	Značaj dokaza koji podupiru preporuku	Promjena u odnosu na preporuke iz 2006.godine
Nema polipa	10	Umjeren	Da
Hiperplastični polip < 10 mm u rektumu ili sigmi	10	Umjeren	Ne
Jedan ili dva tubularna adenoma < 10 mm	5 - 10	Umjeren	Da
Tri do deset tubularnih adenoma	3	Umjeren	Da
Više od deset tubularnih adenoma	< 3	Umjeren	Ne
Jedan ili dva tubularna adenoma > 10 mm	3	Visok	Da
Jedan ili dva vilozna adenoma	3	Umjeren	Da
Adenom s displazijom visokog stupnja	3	Umjeren	Ne
Nazubljeni adenomi			
- < 10 mm, bez displazije	5	Nizak	
- > 10 mm, bez displazije	3	Nizak	
- s prisutnom displazijom	3	Nizak	
- tradicionalni nazubljeni adenom	3	Nizak	

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Izraženost koneksina 43 snižena je u adenomatoznim polipima debelog crijeva visokog stupnja displazije u odnosu na adenomatozne polipe niskog stupnja displazije, te u odnosu na morfološki normalnu sluznicu debelog crijeva.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Odrediti izraženost koneksina 43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva niskog stupnja displazije, adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije, te u morfološki normalnoj sluznici stijenke crijeva nasuprot polipa.

3.2. Specifični ciljevi :

1. Usporediti izraženost koneksina 43 u adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije prema izraženosti u adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije, te u odnosu na izraženost u morfološki nepromjenjenoj sluznici crijeva.
2. Usporediti izraženost koneksina 43 u sluznici crijeva uz polip niskog stupnja displazije, prema onoj uz polip visokog stupnja displazije.
3. Usporediti izraženost koneksina 43 u odnosu na pojedine kliničke parametre.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

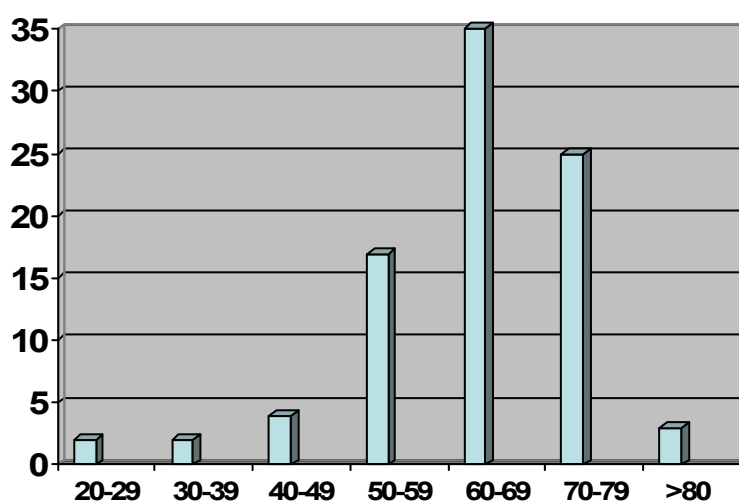
U prospektivno istraživanje koje je provedeno na Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, uključeno je 87 bolesnika kojima je između 27. travnja i 30. studenog 2011. godine na indicaciju učinjena kolonoskopija i endoskopska resekcija adenomatoznih polipa debelog crijeva. Od ukupnog broja ispitanika bila je 21 (24 %) žena i 66 (76 %) muškaraca, a u trenutku endoskopskog zahvata bolesnici su bili u dobi između 28 i 82 godine (medijan 65)(slika 7).

Uključeni su samo oni bolesnici koji su zadovoljavali sljedeće uvjete :

1. bolesnici su dragovoljno pristali sudjelovati u istraživanju i potpisali su Informirani pristanak
2. za bolesnika postoje svi potrebni klinički podaci i adekvatni patohistološki nalaz.

Isključeni su bolesnici koji :

1. imaju drugi maligni visceralni tumor i/ili polipozni sindrom
2. bolesnici koji iz bilo kojeg razloga nisu pristali na uključivanje u istraživanje i nisu potpisali Informirani pristanak.



Slika 7. Dobna struktura ispitivane populacije

Od svakog pojedinog bolesnika za analizu je uzet jedan adenomatozni polip i nasuprotna, endoskopski izgledom zdrava sluznica, koja niti patohistološki nije imala značajnih promjena.

Prema patohistološkom nalazu adenomatoznog polipa debelog crijeva, ispitanici su svrstani u dvije skupine: prva skupina su bili ispitanici s adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije, a druga skupina ispitanici s adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije.

Osim histološkog materijala, od svakog ispitanika su dodatno uzeti podaci o pojedinim kliničkim odrednicama, ispitanikovim funkcijama i navikama, te laboratorijski nalazi (stolica na okultno krvarenje, hemoglobin, glukoza u krvi, željezo, hepatogram i lipidogram), ne stariji od 3 mjeseca.

Komplikacije su se tijekom endoskopske resekcije adenoma dogodile kod tri bolesnika (3,3 %). Kod dva bolesnika (2,2 %) je bila riječ o krvarenju: kod jednog bolesnika tijekom zahvata (1,1%), a kod drugog peti postresekcijski dan (1,1 %). Kod jednog bolesnika (1,1 %) razvio se je postpolipektomijski sindrom. Sve su komplikacije riješene konzervativno: kod bolesnika s krvarenjem postavljanjem hemostatskih kopči tijekom endoskopskog zahvata, odnosno ponovljenog endoskopskog zahvata kod bolesnika s odgođenim krvarenjem, te antibiotikom širokog spektra kod bolesnika postpolipektomijskim sindromom. Ponavljanje kolonoskopije bilo je potrebno kod samo jednog bolesnika (1,1 %). Komplikacije kao posljedice dodatne biopsije sluznice nije bilo.

Klinički podaci o bolesnicima, podaci o patohistološkom nalazu i podaci o praćenju bolesnika dostupni su kod doktoranta, te u arhivi bolesnika i bazi podataka Klinike za internu medicinu i Zavoda za patologiju, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Svaki bolesnik dobio je jedinstveni identifikacijski broj pod kojim je bio uključen u istraživanje, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka, bio je poznat samo glavnom istraživaču.

4.2. Metode

U istraživanju je korišteno tkivo adenomatoznog polipa debelog crijeva i tkivo bioptirane zdrave sluznice stijenke crijeva nasuprot adenomatoznom polipu, bolesnika koji su zadovoljavali ranije navedene uvjete.

Bolesnicima koji su upućeni na kolonoskopski pregled zbog resekcije adenoma debelog crijeva ponuđeno je sudjelovanje u istraživanju. Kod onih koji su pristali na sudjelovanje u istraživanju, nakon što su potpisali Informirani pristanak, dodatno je uzeta detaljna anamneza, te je učinjen uvid u raniju medicinsku dokumentaciju. Potom je učinjena kolonoskopija i planirana endoskopska resekcija adenomatoznog polipa, pri čemu je dodatno uzeta biopsija izgledom zdrave sluznice crijeva nasuprot polipa.

Patohistološki uzorci adenomatoznih polipa i biopsija pohranjeni su na Kliničkom zavodu za patologiju, gdje je učinjena fiksacija tkiva u 10 % -tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin. Nakon deparafiniziranja tkiva dodatno je učinjeno imunohistokemijsko bojanje na antigen proteina pukotinastih spojišta - koneksin 43. Bojanje je učinjeno po protokolu Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase (MSIP protocol), na DAKO Tech-Mate TM Horizon (DAKO, Copenhagen, Denmark) automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje. U istraživanju je korišteno poliklonalno kozje IgG protutijelo na koneksin 43 (sc-6 560, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, razrjeđenje 1 : 300).

Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo debelog crijeva. U negativnoj kontroli je primarno protutijelo zamjenjeno izotipskim imunoglobulinom.

Rezultati imunohistokemijske analize za koneksin 43 prikazani su semikvantitativno, određivanjem postotka imunoreaktivnih stanica u adenomu i sluznici debelog crijeva. Postotak imunoreaktivnih stanica na Cx43 određivan je na cijeloj površini odabranog prereza adenomatoznog polipa i bioptata sluznice debelog crijeva, a podijelili smo ga u tri skupine izraženosti: 0 - negativna izraženost (do 10% pozitivnih stanica), 1- srednje visoka izraženost (10 do 50 % pozitivnih stanica) i 2 - visoka izraženost (više od 50 % pozitivnih stanica).

4.3. Statistička analiza

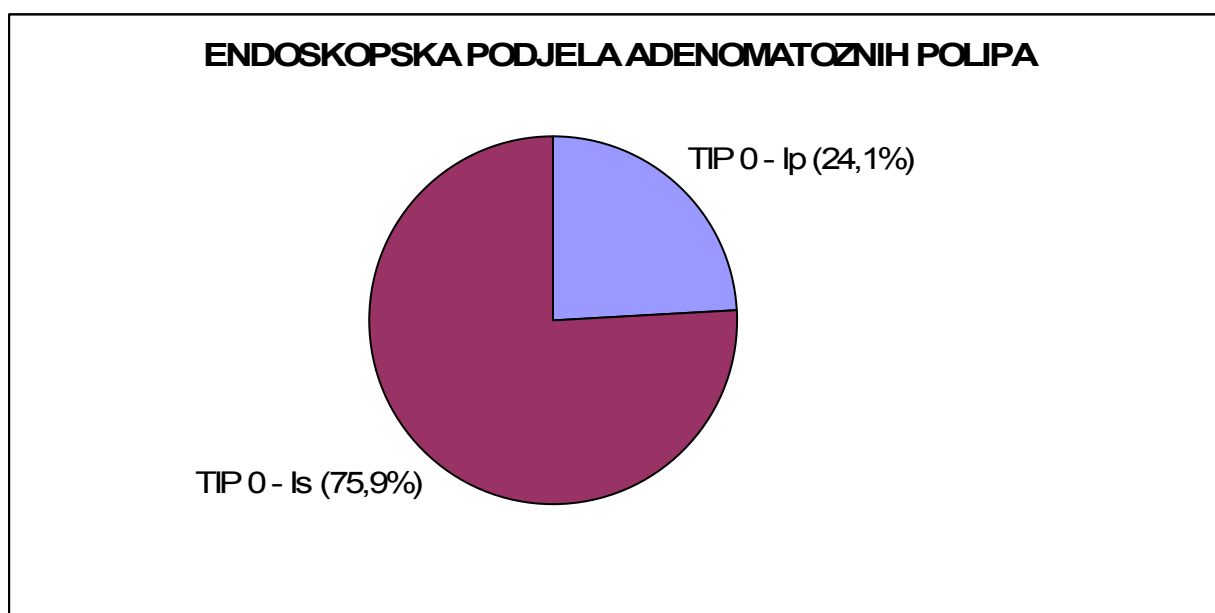
Podaci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je deskriptivna statistika s odgovarajućim prikazima centralne tendencije za kvantitativne varijable (aritmetička sredina i standardna devijacija), te apsolutnim frekvencijama i učestalostima za kvalitativne i kategorijske varijable. Analiza raspodjele podataka je napravljena Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Razlike u distribuciji kvalitativnih i kategorijskih varijabli analizirane su hi kvadrat testom. Razlike u prosječnim vrijednostima između kvantitativnih podataka su napravljene nezavisnim t - testom. Izračunati su korelacijski koeficijenti po Pearsonu između pojedinih kliničkih varijabli i izraženosti koneksina. Sve p vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. Dobiveni rezultati su prikazani koristeći tablice, dijagrame i slike karakterističnih patohistoloških preparata, koji su od značaja za razmišljanje postupka, vodeći brigu o anonimnosti bolesnika. U analizi se koristila statistička podrška IBM SPSS_Statistics, verzija 19.0.0.1 (www.spss.com).

5. REZULTATI

5.1. Usporedba pojedinih kliničkih i patohistoloških odrednica promatranih skupina ispitanika

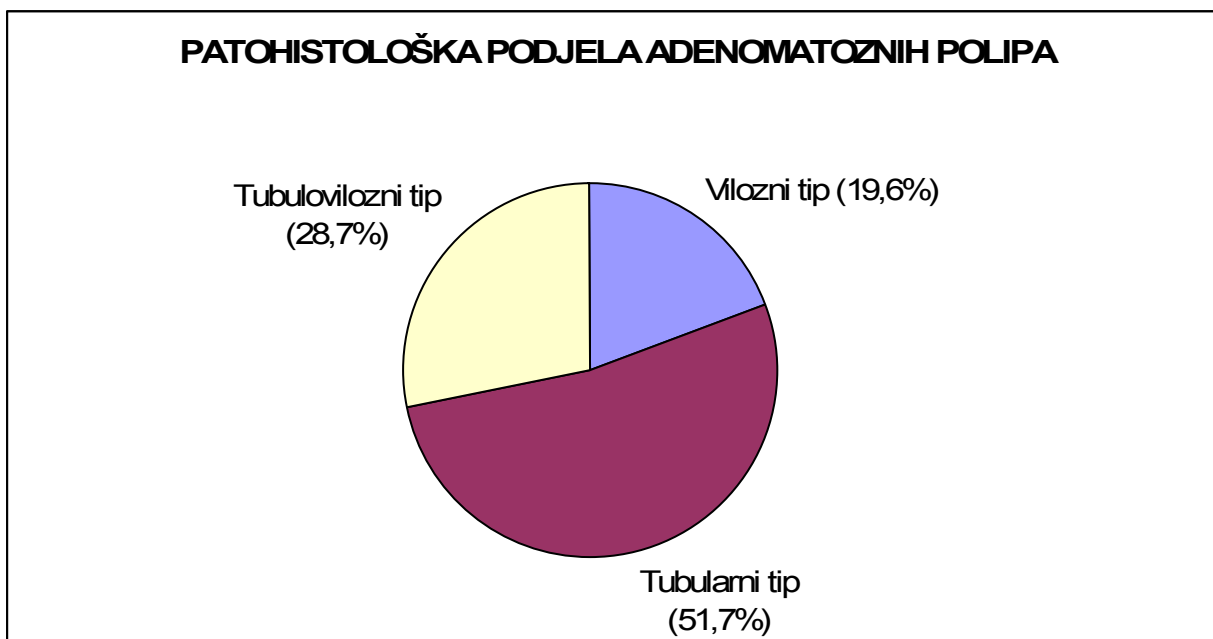
U istraživanje je ukupno uključeno 43 bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije (adenom „low grade“, ALG, 49,4 %) i pripadajućim sluznicama (sluznica uz „low grade“ adenom, SLG), te 44 bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije (adenom „high grade“, AHG, 50,6 %) i pripadajućim sluznicama (sluznica uz „high grade“ adenom, SHG).

Prema endoskopskom nalazu u skladu s Pariškom klasifikacijom bilo je 66 adenoma tipa 0-Is (75,9 %) i 21 adenom tipa 0-Ip (24,1%) (slika 8).



Slika 8. Raspodjela ispitanika prema endoskopskoj pojavnosti adenomatoznih polipa

Patohistološki gledano, adenomi su najčešće bili tubularnog tipa (45 ili 51,7 %), zatim tubuloviloznog tipa (25 ili 28,7 %), a najrjeđi su bili viloznog tipa (17 ili 19,6 %)(slika 9).



Slika 9. Raspodjela ispitanika prema patohistološkom tipu adenoma

Učinjena je usporedba pojedinih kliničkih, patohistoloških, endoskopskih i laboratorijskih odrednica između ispitivanih skupina: skupine ispitanika s adenomatoznim polipom debelog crijeva niskog stupnja displazije (ALG) naspram skupine ispitanika s adenomatoznim polipom visokog stupnja displazije (AHG), a rezultati su prikazani u tablici (tablice 5 - 7).

Tablica 5. Usporedba pojedinih patohistoloških, endoskopskih i laboratorijskih odrednica između skupine bolesnika s adenomom niskog stupnja (ALG) i visokog stupnja (AHG) displazije

		ALG		AHG	
		N	%	N	%
Histološki tip *	Tubularni	30	69,8 %	15	34,1 %
	Vilozni	4	9,3 %	13	29,5 %
	Tubulovilozni	9	20,9 %	16	36,4 %
Endoskopski tip*	Tip 0-Ip	3	7,0 %	18	40,9 %
	Tip 0-Is	40	93,0 %	26	59,1 %
Lokacija	Desni kolon	13	30,2 %	12	27,3 %
	Lijevo kolon	30	69,8 %	32	72,7 %
Detaljna lokacija	Cekoascedens	10	23,3 %	7	15,9 %
	Transverzum	4	9,3 %	5	11,4 %
	Desc. i sigma	22	51,2 %	25	56,8 %
	Rektum	7	16,3 %	7	15,9 %
Hiperlipoproteinemija	Ne	29	67,4 %	33	75,0 %
	Da	14	32,6 %	11	25,0 %
Pozitivan test okultnog krvarenja	Ne	16	45,7 %	8	25,0 %
	Da	19	54,3 %	24	75,0 %

*p < 0,05

Tablica 6. Usporedba pojedinih kliničkih odrednica između skupine bolesnika s adenomom niskog (ALG) i visokog (AHG) stupnja displazije

		ALG		AHG	
		N	%	N	%
Spol	Ženski	9	20,9 %	12	27,3 %
	Muški	34	79,1 %	32	72,7 %
Bol u trbuhu	Ne	33	76,7 %	36	81,8 %
	Da	10	23,3 %	8	18,2 %
Krv u stolici	Ne	21	48,8 %	22	50,0 %
	Da	22	51,2 %	22	50,0 %
Promjena ritma stolice	Ne	32	74,4 %	34	77,3 %
	Da	11	25,6 %	10	22,7 %
Obstipacija	Ne	32	74,4 %	30	68,2 %
	Da	11	25,6 %	14	31,8 %
Koristi laksative	Ne	33	76,7 %	30	68,2 %
	Da	10	23,3 %	14	31,8 %
Konzistencija stolice	Proljev	10	23,3 %	9	20,5 %
	Normalna	21	48,8 %	23	52,3 %
	Tvrda	12	27,9 %	12	27,3 %
Tip kuhinje	Mediterranska	3	7,0 %	3	6,8 %
	Kontinentalna	35	81,4 %	31	70,5 %
	Ostalo	5	11,6 %	10	22,7 %
Pušenje	Nepušač	23	53,5 %	16	36,4 %
	Pušač	14	32,6 %	13	29,5 %
	Bivši pušač	6	14,0 %	15	34,1 %
Alkohol	Ne pije	25	58,1 %	28	63,6 %
	Pije	17	39,5 %	12	27,3 %
	U anamnezi	1	2,3 %	4	9,1 %
Salicilati	Ne uzima	33	76,7 %	35	79,5 %
	Uzima	10	23,3 %	9	20,5 %
Ca kolona u obitelji	Ne	36	83,7 %	36	81,8 %
	Da	7	16,3 %	8	18,2 %

*p < 0,05

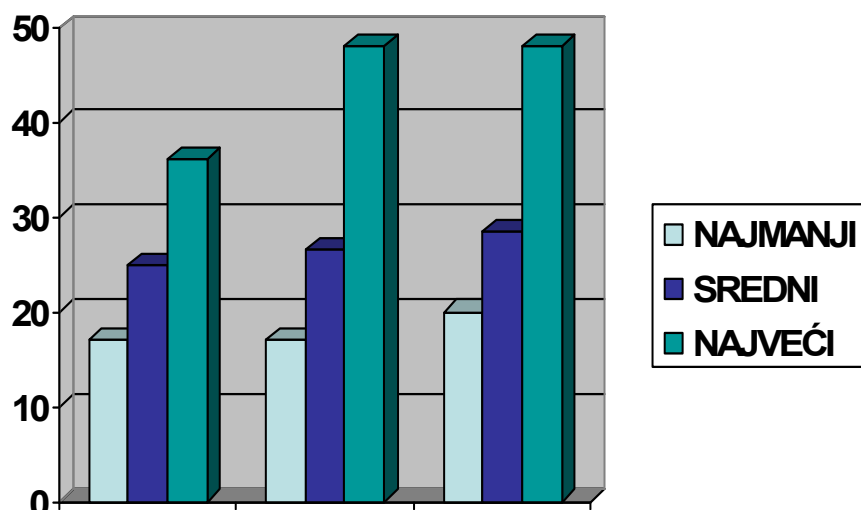
Tablica 7. Usporedba pojedinih kliničko - patoloških i endoskopskih odrednica između bolesnika s adenomom niskog (ALG) i visokog (AHG) stupnja displazije

	PHD skupina	N	Aritmetička sredina	SD	P
Dob (godine)	ALG	43	65,40	10,55	0,296
	AHG	44	62,75	12,78	
BMI (kg/m ²)	ALG	43	24,79	3,82	< 0,001
	AHG	44	28,36	5,18	
Veličina adenoma na patološkom preparatu (mm)	ALG	43	6,21	2,56	< 0,001
	AHG	44	10,59	6,43	
Veličina adenoma endoskopski (mm)	ALG	43	10,77	3,18	< 0,001
	AHG	44	15,91	8,70	
Broj stolica / tjedan	ALG	43	8,21	4,37	0,963
	AHG	44	8,16	5,65	

Od ukupno 87 bolesnika, u skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije bilo je 9 (21 %) žena i 34 (79 %) muškaraca, a u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije 12 (27 %) žena i 32 (73 %) muškarca. Statistički gledano nije bilo značajne razlike u razdiobi po spolovima između promatranih skupina ($p = 0,812$), a u obje skupine su prevladavali muškarci.

U skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije prosječna dob je bila 65,4 godine (medijan 67, raspon 28 - 79), a u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije 62,75 godina (medijan 64,5, raspon 24 - 82). Statistički nije nađena značajna razlika u dobi između skupina ($p = 0,296$).

Prosječni indeks tjelesne mase (BMI) iznosio je 26,6 (medijan 26, raspon 17 - 48). Za skupinu bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije prosječni BMI je bio 24,79 (medijan 24, raspon 17 - 36), a u skupini s adenomom visokog stupnja displazije 28,4 (medijan 27,5, raspon 20 - 48). Nađena je statistički značajna razlika među skupinama ($p < 0,001$). Bolesnici s adenomima visokog stupnja displazije imali su značajno viši BMI od bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije (slika 10).



Slika 10. BMI u skupinama bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije (ALG), visokog stupnja displazije (AHG) i ukupno

Bolesnici s adenomom debelog crijeva žalili su se na nespecifične, dispeptične, tegobe, te bol u trbuhu. Od svih bolesnika, njih 18 (20,7 %) je signaliziralo bol u trbuhu. Razlike između skupine bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije, gdje je bilo 10 bolesnika s boli u trbuhu (23,3 %), naprema skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije, gdje je bilo 8 bolesnika s boli u trbuhu (18,2 %), nije bilo ($p = 0,559$). Statistički značajna razlika među ispitivanim nađena je u simptomu dispepsije ($p = 0,005$). Na nju se žalio ukupno 21 bolesnik (18,27 %). Od toga je 16 bolesnika (37,2 %), bilo u skupini s adenomom niskog stupnja displazije, a 5 (11,4 %) u skupini s adenomom visokog stupnja displazije. Simptom dispepsije bio je češći u bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije.

Krv u stolici su primijetila ukupno 44 bolesnika (50,6 %). U skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije bilo je 22 bolesnika (51,2 %) s primjesom krvi u stolici, isto koliko i u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije, dakle 22 bolesnika ili 50 %. Razlike u pojavi primjese krvi u stolici među ispitivanim skupinama nisu nađene ($p = 0,914$).

Test na okultno krvarenje učinjen je kod 67 (77 %) bolesnika, a bio je pozitivan kod 43 (64 %) bolesnika. Nešto češće je nalaz bio pozitivan u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije, gdje su bila pozitivna 24 bolesnika od 32 kod kojih je test učinjen, odnosno 75 % pozitivnih. U skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije bilo je 19 pozitivnih od 35 testiranih, odnosno 54,3 % pozitivnih. Razlika u broju pozitivnih testova na

okultno krvarenje među promatranim skupinama nije bila statistički značajna ($p = 0,077$).

Što se navika tiče, nešto je veći udio pušača među ispitanicima s adenomom niskog stupnja displazije (53,5 % naprema 36,4 %), što statistički gledano nije značajno ($p = 0,680$). Ako tom broju dodamo broj bivših pušača, tada se razlika među skupinama i na očigled gubi (67,5 % naprema 70,5 %).

Alkohol je u obje skupine konzumirao podjednak broj ispitanika, 58,1 % bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije, naprema 63,6 % bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije. Nije bilo statistički značajne razlike u konzumaciji alkohola među ispitivanim skupinama ($p = 0,244$).

Hiperlipoproteinemiju je od ukupnog broja ispitanika imalo 25 (29 %) bolesnika. Od toga je u skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije hiperlipoproteinemiju imalo 14 (32,6 %) bolesnika, a u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije 11 (25 %) bolesnika. Statistički značajna razlika među skupinama ispitanika prema prevalenciji hiperlipoproteinemije nije nađena ($p = 0,436$).

Redovitu terapiju acetilsalicilnom kiselinom od ukupnog broja ispitanika uzimalo je njih 19 (21,8 %). Od toga je u skupini s adenomom niskog stupnja displazije salicilate uzimalo 10 (23,3 %) bolesnika, a u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije 9 (20,5 %) bolesnika. Nije bilo statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama u odnosu na uzimanje salicilata u terapiji ($p = 0,752$).

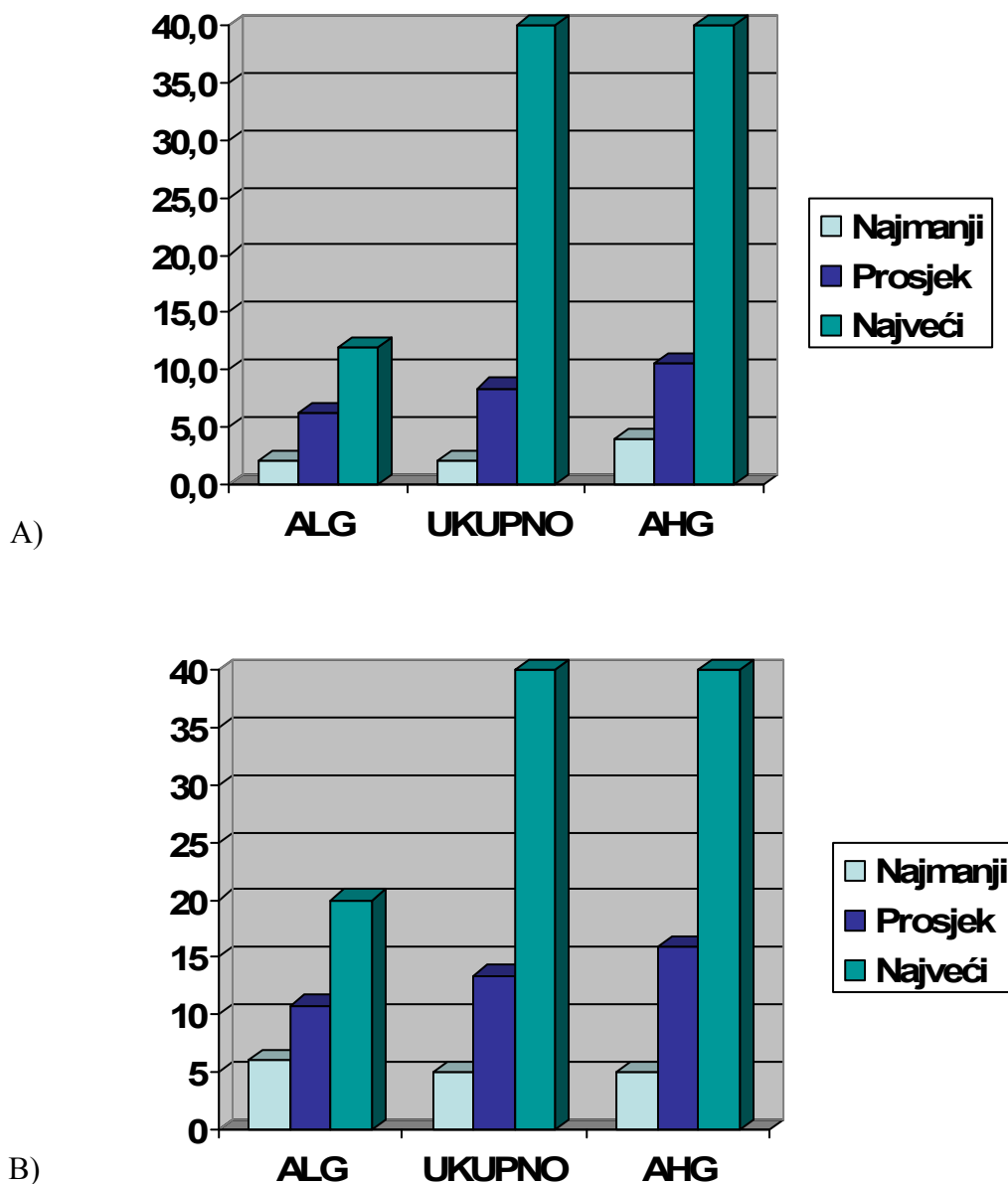
U obiteljskoj anamnezi bliskih srodnika (srodnika u prvom i drugom koljenu), rak debeloga crijeva imalo je 7 (16,3 %) ispitanika iz skupine s adenomom niskog stupnja displazije, te 8 (18,2 %) ispitanika iz skupine bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije. Nisu nađene statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama u prisutnosti raka debeloga crijeva u bliskih srodnika ($p = 0,814$). Malignu bolest u obitelji imalo je 11 (25,6 %) ispitanika iz prve skupine, te 10 (22,7 %) ispitanika iz druge skupine. Nisu nađene statistički značajne razlike među skupinama u pojavnosti maligne neoplazme u široj obitelji ($p = 0,756$).

Preraspodjela adenomatoznih polipa u crijevu bila je uglavnom očekivana. Većina adenoma nalazila se u silaznom dijelu debeloga crijeva, sigmi i rektumu (70 %), a manji broj u cekumu, uzlaznom i poprečnom debelom crijevu (30 %). Od toga je 20 % polipa nađeno u cekumu i uzlaznom debelom crijevu, 10 % u poprečnom dijelu crijeva, 54 % u silaznom i sigmoidnom debelom crijevu, te 16 % u rektumu. Razlike među skupinama u lokalizaciji adenoma u crijevu nije bilo ($p = 0,760$).

Adenomatozni polipi su na patološkom preparatu bili prosječne veličine 8,43 mm

(medijan 7 mm, raspon 2 - 40). Adenomi niskog stupnja displazije prosječno su mjerili 6,21 mm (medijan 6 mm, raspon 2 - 12), a oni visokog stupnja displazije 10,59 mm (medijan 10 mm, raspon 4 - 40). Mjereno na patohistološkom preparatu, adenomatozni polipi visokog stupnja displazije bili su statistički značajno veći ($p < 0,001$)(slika 11 A).

Endoskopski mjereno, prosječna veličina adenomatoznog polipa bila je 13,37 mm. Adenomi niskog stupnja displazije prosječno su mjerili 10,77 mm (medijan 10 mm, raspon 6 - 20), a adenomi visokog stupnja displazije 15,91mm (medijan 13 mm, raspon 5 - 40)(slika 11 B). Mjereno endoskopski, adenomatozni polipi visokog stupnja displazije bili su statistički značajno veći ($p < 0,001$).

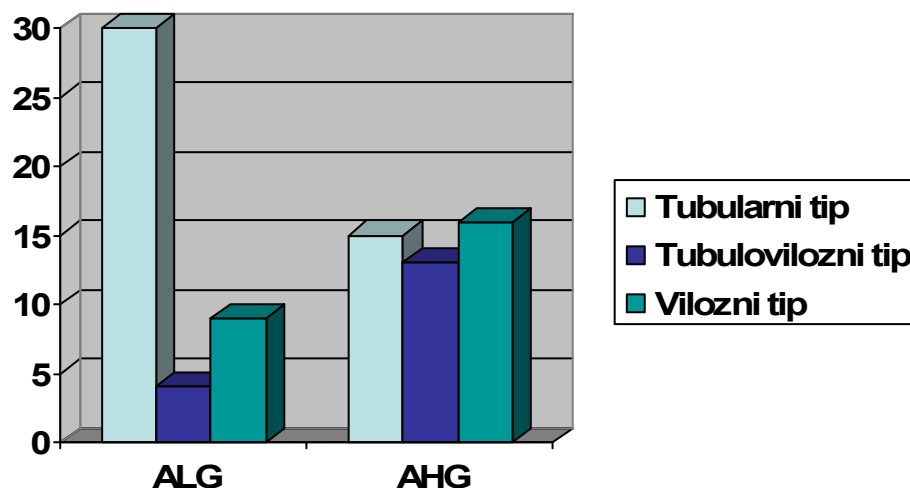


Slika 11. Veličina adenomatoznih polipa

(A) Veličina mjerena na patohistološkom preparatu, (B) Veličina mjerena na endoskopskom preparatu (ALG - adenom niskog stupnja displazije, AHG - adenom visokog stupnja displazije).

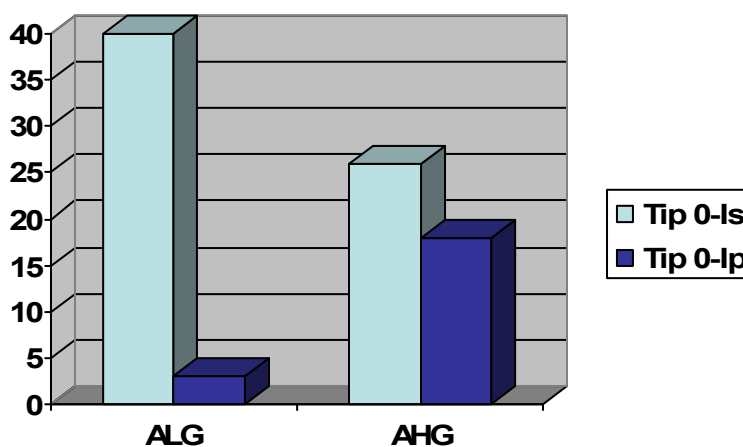
Gledajući podjelu adenomatoznih polipa prema patohistološkim značajkama, adenomi niskog stupnja displazije najčešće su bili tubularnog tipa (69,8 %), zatim tubuloviloznog tipa (20,9 %), te viloznog tipa histologije (9,3 %), dok su adenomatozni polipi visokog stupnja displazije najčešće bili tubuloviloznog tipa (36,4 %), zatim tubularnog tipa (34,1 %) i viloznog tipa histologije (29,5 %). Adenomatozni polipi visokog stupnja displazije češće su

bili viloznog ili tubuloviloznog tipa, a adenomatozni polipi niskog stupnja displazije tubularnog tipa, što je i statistički značajna razlika ($p = 0,003$)(slika 12).



Slika 12. Podjela adenoma niskog stupnja displazije (ALG) i adenoma visokog stupnja displazije (AHG) prema histološkom tipu

Gledajući podjelu adenomatoznih polipa prema endoskopskim značajkama, adenomi niskog stupnja displazije najčešće su bili tipa 0-Is (93,0 %), dok su adenomi visokog stupnja displazije češće bili tipa 0-Ip (59,1 %), što je statistički značajna razlika ($p = 0,002$)(slika 13).



Slika 13. Podjela adenomatoznih polipa debelog crijeva niskog (ALG) i visokog (AHG) stupnja displazije prema endoskopskim značajkama u skladu s Pariškom klasifikacijom (20)

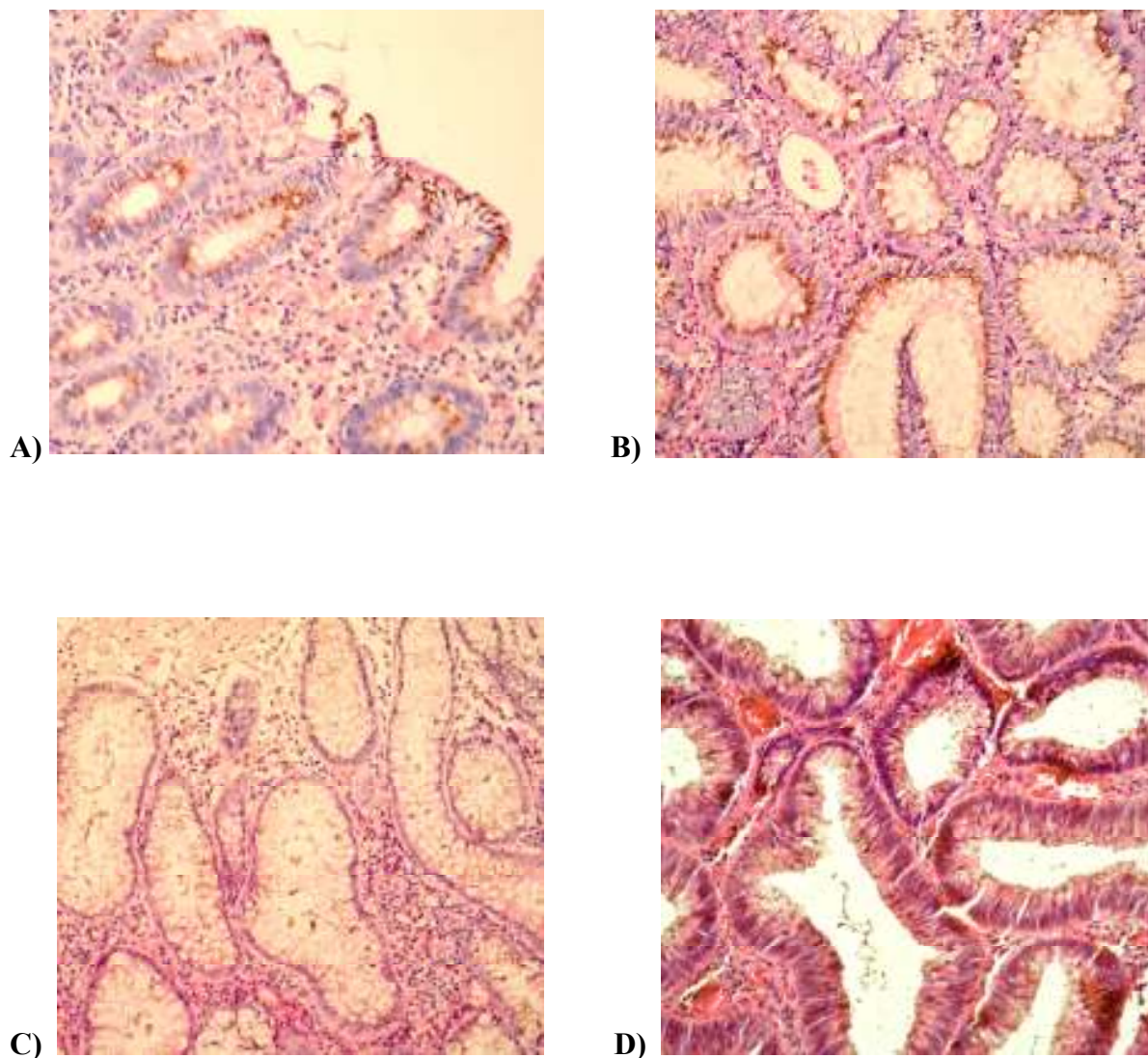
Naši bolesnici češće su konzumirali kontinentalni tip prehrane u odnosu na mediteranski tip prehrane, a razlike među skupinama nije bilo ($p = 0,387$).

Promjene ritma pražnjenja crijeva ($p = 0,756$), konzistencija stolice ($p = 0,936$), pojava obstipacije ($p = 0,520$) i uporaba laksativa ($p = 0,372$), te tjedni broj stolica ($p = 0,218$), također se nisu razlikovali prema skupinama.

5.2. Izraženost koneksina 43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva i nasuprotnoj zdravoj sluznici u promatranim skupinama ispitanika

Izraženost Cx43 nađena je u epitelnim stanicama pokrovnog epitela i epitela kripti adenomatoznih polipa debeloga crijeva niskog i visokog stupnja displazije, te zdrave sluznice debeloga crijeva nasuprot adenoma.

Imunohistokemijska reakcija na Cx43 u zdravoj sluznici debeloga crijeva nalazila se isključivo na membranama epitelnih stanica (slika 14 A). Imunohistokemijska reakcija na Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva nalazila se također u pokrovnom epitelu i epitelu kripti na membranama i u citoplazmi epitelnih stanica (slika 14 B-C). Membranska reakcija je i kod zdrave sluznice i kod adenoma bila sitno zrnata, smještena najčešće na bočnim staničnim membranama, dakle među stanicama, i to u apikalnom (luminalnom) dijelu stanice (slika 14 A-C), rjeđe u srednjem dijelu stanice, a iznimno je bila smještena na membrani luminalne strane stanice (slika 14 D). Citoplazmatska reakcija u adenomima bila je grubo zrnata (slika 14 C-D).



Slika 14. Imunohistokemijska izraženost Cx43 u zdravoj sluznici i adenomima debelog crijeva

(A) Zdrava sluznica je pokazivala sitno zrnatu membransku izraženost Cx43, (B) Adenomi su pokazivali sitno zrnatu membransku izraženost Cx43 (na slici je adenom niskog stupnja displazije), (C) i (D) Dio adenoma je pokazivao istovremeno sitno zrnatu membransku izraženost i grubo zrnatu citoplazmatsku izraženost Cx43 (na slici C je adenom niskog stupnja displazije, na slici D je adenom visokog stupnja displazije), (D) Cx43 je u u adenomima i zdravoj sluznici rijetko bio izražen na luminalnoj strani epitelne stanice (na slici je adenom visokog stupnja displazije).

Izraženost koneksina Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva bila je negativna u 25 adenoma (28,7 %), srednje visoka u 40 adenoma (46,0 %) i visoka u 22 adenoma (25,3 %). Izraženost Cx43 pokazivala su ukupno je 62 adenoma (71,3 %)(tablica 8). Pritom je 29 adenoma (46,8 %) pokazivalo membransku reakciju na Cx43, a 33 adenoma (53,2 %) mješanu, membransku i citoplazmatsku reakciju na Cx43.

Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva niskog stupnja displazije bila je negativna u 12 adenoma (27,9%), srednje visoka u 23 adenoma (53,5 %) i visoka u 8 adenoma (18,6 %). Ukupno je 31 adenom niskog stupnja displazije (72,1 %) bio pozitivan na Cx43, a 12 (27,9 %) ih je bilo negativnih. Pritom je 15 adenoma (48,4 %) pokazivalo membransku reakciju na Cx43, a 16 adenoma (51,6 %) mješanu, membransku i citoplazmatsku reakciju na Cx43.

Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva visokog stupnja displazije bila je negativna u 13 adenoma (29,5 %), srednje visoka u 17 adenoma (38,6 %) i visoka u 14 adenoma (31,8 %). Ukupno je 31 adenom visokog stupnja displazije (70,5 %) bio pozitivan na Cx43, a 13 (29,5 %) ih je bilo negativnih. Pritom je 14 adenoma (45,2 %) pokazivalo membransku reakciju na Cx43, a 17 adenoma (54,8 %) mješanu, membransku i citoplazmatsku reakciju na Cx43.

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici uzorkovanoj nasuprot adenomatoznog polipa debeloga crijeva bila je negativna u 42 sluznice (48,3 %), srednje visoka u 30 sluznica (34,5 %) i visoka u 15 sluznica (17,2%). Ukupno je 45 sluznica (51,7 %) pokazivalo pozitivnu izraženost Cx43 (tablica 8).

Tablica 8. Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva i nasuprotnoj zdravoj sluznici

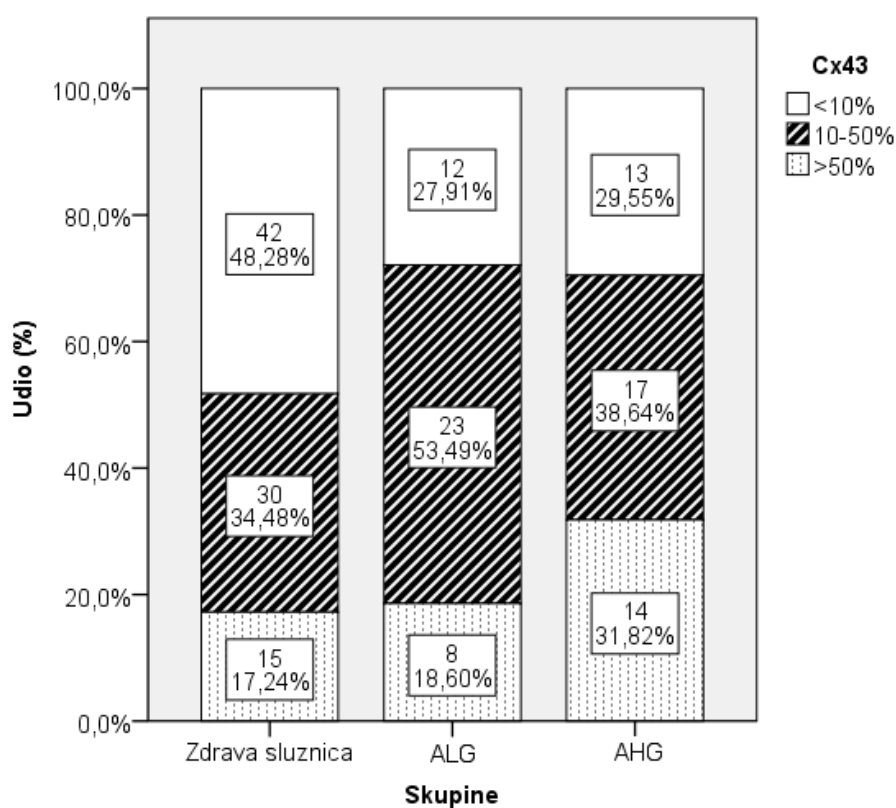
Materijal	Reakcija	Cx43 negativni	Cx43 srednje visoko pozitivni	Cx43 visoko pozitivni	Ukupno pozitivnih na Cx43
Adenomi debelog crijeva, ukupno	Membranska i citoplazmatska	25 (28,7 %)	40 (46 %)	22 (25,3 %)	62 (71,3 %)
Adenomi niskog stupnja displazije		12 (27,9 %)	23 (53,5 %)	8 (18,6 %)	31 (72,1 %)
Adenomi visokog stupnja displazije		13 (29,5 %)	17 (38,6 %)	14 (31,8 %)	31 (70,5 %)
Zdrava sluznica nasuprot adenoma	Membranska	42 (48,3 %)	30 (34,5 %)	15 (17,2 %)	45 (51,7 %)

Usporedbom izraženosti Cx43 među skupinama adenoma niskog stupnja displazije, adenoma visokog stupnja displazije i zdrave sluznice u okolini adenoma, nađene su statistički značajne razlike ($p = 0,039$)(tablica 9)(slika 15).

Tablica 9. Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije (ALG), visokog stupnja displazije (AHG) i nasuprotnoj zdravoj sluznici debelog crijeva

			Cx43			Ukupno
			< 10 %	10 - 50 %	> 50 %	
Skupine	Zdrava sluznica	N	42	30	15	87
		%	48,3 %	34,5 %	17,2 %	100,0 %
	ALG	N	12	23	8	43
		%	27,9 %	53,5 %	18,6 %	100,0 %
	AHG	N	13	17	14	44
		%	29,5 %	38,6 %	31,8 %	100,0 %
Ukupno	N	67	70	37	174	
	%	38,5 %	40,2 %	21,3 %	100,0 %	

	Vrijedno st	df	P
X2 test	10,060 ^a	4	0,039
Ukupno	174		



Slika 15. Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije (ALG), visokog stupnja displazije (AHG) i nasuprotnoj zdravoj sluznici debelog crijeva

Usporedbom izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva niskog stupnja displazije, naprema izraženosti u adenomima visokog stupnja displazije, nismo našli statistički značajnu razliku ($p = 0,227$)(tablica 10). Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva nije se razlikovala u ovisnosti od stupnja displazije u adenomu.

Tablica 10. Razlika izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa debelog crijeva niskog stupnja displazije (ALG) i visokog stupnja displazije (AHG)

			Cx43			UKUPNO
			<10 %	10-50 %	>50 %	
ALG	N		12	23	8	43
	%		27,9 %	53,5 %	18,6 %	100,0 %
AHG	N		13	17	14	44
	%		29,5 %	38,6 %	31,8 %	100,0 %
Ukupno	N		25	40	22	87
	%		28,7 %	46 %	25,3 %	100,0 %

	Vrijednost	Df	P
Hi kvadrat test	2,565	2	0,227
Ukupno ispitanika	87		

Kada smo adenomatozne polipe visokog i niskog stupnja displazije svrstali u dvije skupine u odnosu na izraženost Cx43 (negativna - manje od 10 % stanica pozitivnih na Cx43 i pozitivna - 10 % i više stanica pozitivnih na Cx43), statistička analiza također nije pokazala statistički značajnu razliku između promatranih skupina ($p = 0,866$)(tablica 11).

Tablica 11. Razlika pozitivne i negativne izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa debeloga crijeva niskog (ALG) i visokog (AHG) stupnja displazije

			Cx43		UKUPNO
			NEG	POZ	
ALG	N		12	31	43
	%		27,9 %	72,1 %	100,0 %
AHG	N		13	31	44
	%		29,5 %	70,5 %	100,0 %
Ukupno		N	25	62	87
		%	28,7 %	71,3 %	100,0 %

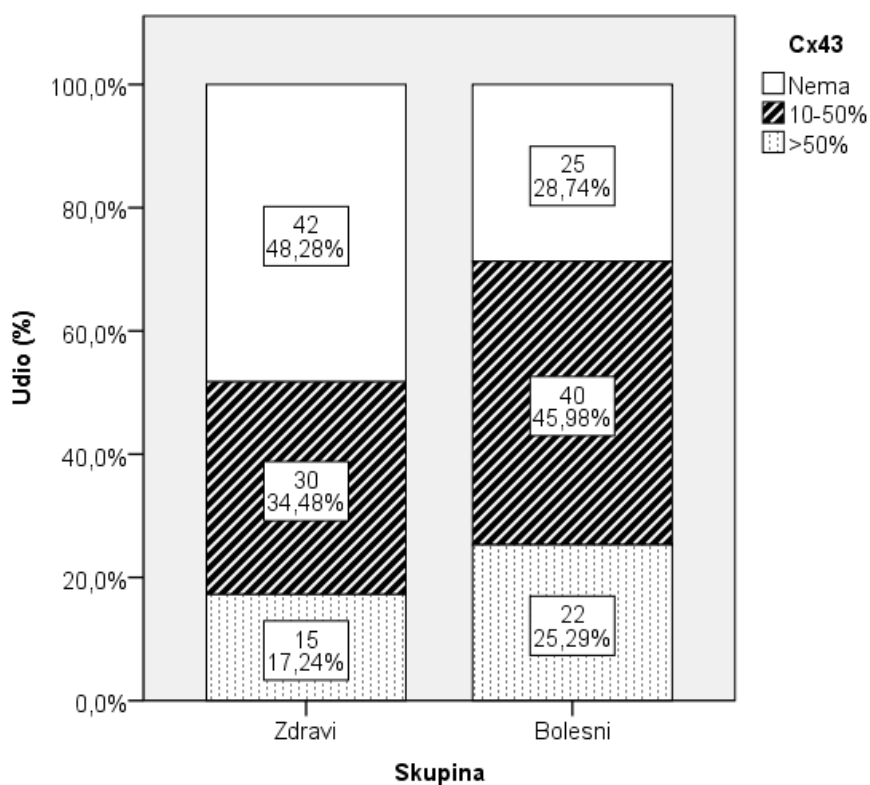
	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	0,029	1	0,866
Ukupno ispitanika	87		

Obzirom na nepostojanje statistički značajne razlike izraženosti Cx43 između adenoma niskog i visokog stupnja displazije, adenome smo udružili u jednu skupinu i usporedili izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima („bolesni”), naprema izraženosti u zdravoj sluznici debeloga crijeva („zdravi”). Usporedbom izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva naprema izraženosti u zdravoj sluznici debeloga crijeva, dobili smo statistički značajnu razliku među promatranim skupinama ($p = 0,029$)(tablica 12)(slika 16). Izraženost Cx43 viša je u adenomatoznim polipima debeloga crijeva, u odnosu na izraženost Cx43 u zdravoj sluznici.

Tablica 12. Razlika u izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa (bolesni) i zdrave sluznice (zdravi) debeloga crijeva

			Cx43			UKUPNO
			< 10 %	10 - 50 %	> 50 %	
Skupina	Zdravi	N	42	30	15	87
		%	48,3 %	34,5 %	17,2 %	100,0 %
	Bolesni (ALG + AHG)	N	25	40	22	87
		%	28,7 %	46,0 %	25,3 %	100,0 %
Ukupno		N	67	70	37	174
		%	38,5 %	40,2 %	21,3 %	100,0 %

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	7,066 ^a	2	0,029
Ukupno ispitanika	174		



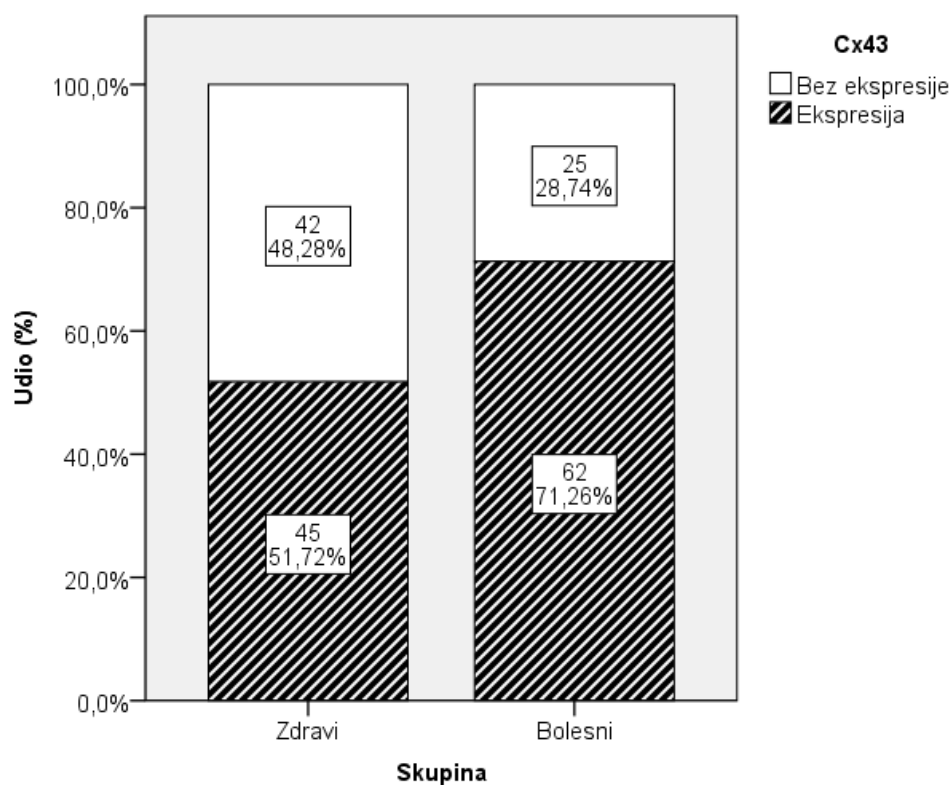
Slika 16. Razlika izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa (bolesni) i zdrave sluznice (zdravi) debeloga crijeva

Kada smo adenomatozne polipe debeloga crijeva i zdravu sluznicu svrstali u dvije skupine u odnosu na izraženost Cx43 (negativna - manje od 10 % stanica pozitivnih na Cx43 i pozitivna - 10 % i više stanica pozitivnih na Cx43), statistička analiza je pokazala statistički još značajniju razliku između promatranih skupina ($p = 0,008$)(tablica 13)(slika 17). Adenomatozni polipi debeloga crijeva su znatno češće pozitivni na Cx43 u odnosu prema zdravoj sluznici debeloga crijeva.

Tablica 13. Razlika pozitivne i negativne izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa (bolesni) i zdrave sluznice (zdravi) debeloga crijeva

			Cx43		UKUPNO
			NEG	POZ	
Skupina	Zdravi	N	42	45	87
		%	48,3 %	51,7 %	100,0 %
	Bolesni	N	25	62	87
	(ALG + AHG)	%	28,7 %	71,3 %	100,0 %
Ukupno		N	67	107	174
		%	38,5 %	61,5 %	100,0 %

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	7,014	1	0,008
Ukupno ispitanika	174		



Slika 17. Razlika pozitivne i negativne izraženosti Cx43 između adenomatoznih polipa (bolesni) i zdrave sluznice (zdravi) debeloga crijeva

Dodatno smo usporedili izraženost Cx43 u zdravoj sluznici nasuprot adenomatoznog polipa u odnosu na stupanj displazije u adenomu.

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici uzorkovanoj nasuprot adenomatoznog polipa debeloga crijeva niskog stupnja displazije (SLG) bila je negativna kod 27 sluznica (62,8 %), slabo pozitivna kod 12 sluznica (27,9 %) i jako pozitivna kod 4 sluznice (9,3 %).

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici uzorkovanoj nasuprot adenomatoznog polipa debeloga crijeva visokog stupnja displazije (SHG), bila je negativna kod 15 sluznica (34,1 %), slabo pozitivna kod 18 sluznica (40,9 %) i jako pozitivna kod 11 sluznica (25,0 %)(tablica14).

Tablica 14. Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici debeloga crijeva uzorkovanoj nasuprot adenomatoznog polipa u odnosu na stupanj displazije u adenomu

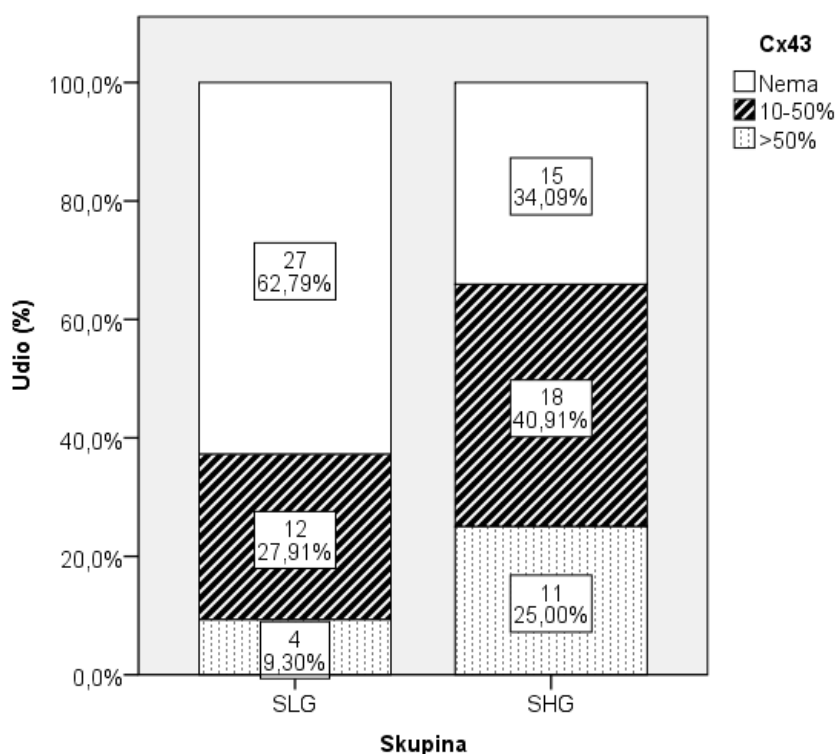
Materijal	Reakcija	Cx43 negativni	Cx43 srednje visoko pozitivni	Cx43 visoko pozitivni	Ukupno pozitivnih na Cx43
Zdrava sluznica nasuprot adenoma, ukupno	Membranska	42 (48,3 %)	30 (34,5 %)	15 (17,2 %)	45 (51,7 %)
Zdrava sluznica nasuprot adenoma niskog stupnja displazije		27 (62,8 %)	12 (27,9 %)	4 (9,3 %)	16 (37,2 %)
Zdrava sluznica nasuprot adenoma visokog stupnja displazije		15 (34,1 %)	18 (40,9 %)	11 (25,0 %)	29 (65,9 %)

Usporedbom izraženosti Cx43 između zdrave sluznice debeloga crijeva nasuprot adenoma niskog stupnja displazije naprema izraženosti u zdravoj sluznici nasuprot adenoma visokog stupnja displazije nađene su statistički značajne razlike. U zdravoj sluznici debeloga crijeva uz adenom visokog stupnja displazije izraženost Cx43 bila je češće negativna, dok je u istoj takvoj sluznici uz adenom niskog stupnja displazije bila viša, odnosno češće pozitivna ($p = 0,019$)(tablica 15)(slika 18).

Tablica 15. Razlika izraženosti Cx43 između zdrave sluznice debelog crijeva uzorkovane nasuprot adenoma niskog (SLG) i visokog (SHG) stupnja displazije

			Cx43			UKUPNO
			< 10 %	10 - 50 %	> 50 %	
PHD skupina	SLG	N	27	12	4	43
		%	62,8 %	27,9 %	9,3 %	100,0 %
	SHG	N	15	18	11	44
		%	34,1%	40,9 %	25,0 %	100,0 %
Ukupno		N	42	30	15	87
		%	48,3 %	34,5 %	17,2 %	100,0 %

	Vrijednost	Df	P
Hi kvadrat test	7,88	2	0,019
Ukupno ispitanika	87		



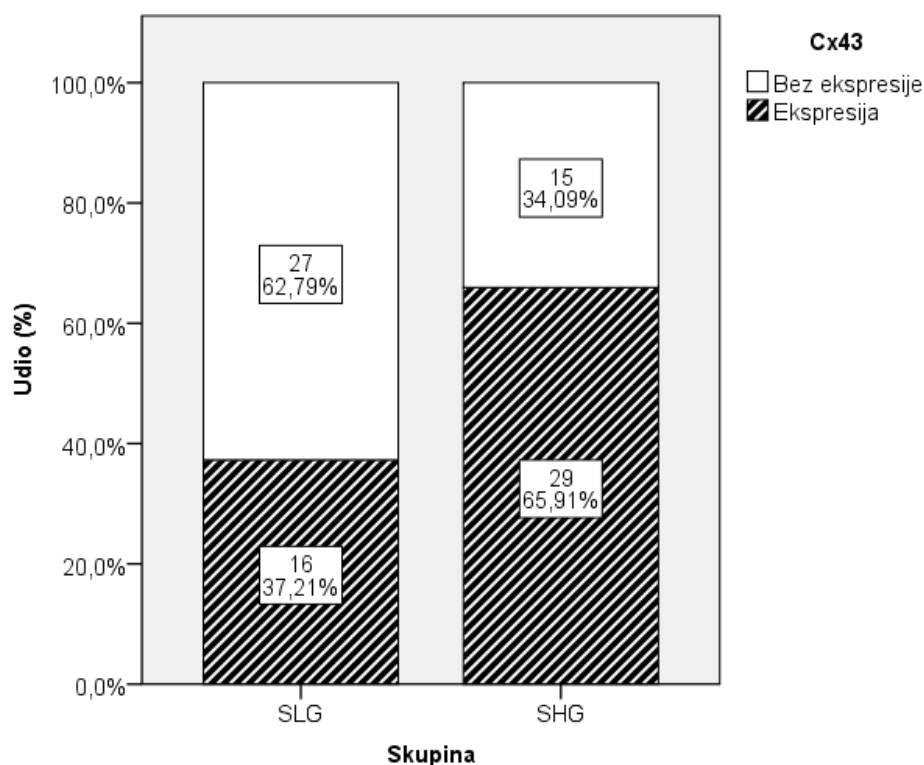
Slika 18. Razlika izraženosti Cx43 između zdrave sluznice debelog crijeva uzorkovane nasuprot adenoma niskog (SLG) i visokog (SHG) stupnja displazije

Kada smo sluznice nasuprot adenoma niskog stupnja displazije i sluznice nasuprot adenoma visokog stupnja displazije svrstali u dvije skupine u odnosu na izraženost Cx43 (negativna - manje od 10 % stanica pozitivnih na Cx43 i pozitivna - 10 % i više stanica pozitivnih na Cx43), dobili smo statistički još značajniju razliku ($p = 0,007$)(tablica 16) (slika 19). Zdrava sluznica nasuprot adenomatoznog polipa debeloga crijeva visokog stupnja displazije ima češće pozitivnu izraženost Cx43 u odnosu prema sluznici nasuprot adenoma niskog stupnja displazije.

Tablica 16. Razlika pozitivne i negativne izraženosti Cx43 između zdrave sluznice debeloga crijeva uzorkovane nasuprot adenoma niskog (SLG) i visokog (SHG) stupnja displazije

			Cx43		UKUPNO
			POZ	NEG	
PHD skupina	SLG	N	27	16	43
		%	62,8 %	37,2 %	100,0 %
	SHG	N	15	29	44
		%	34,1%	65,9 %	100,0 %
Ukupno		N	42	45	87
		%	48,3 %	51,7 %	100,0 %

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	7,17	1	0,007
Ukupno ispitanika	87		



Slika 19. Razlika pozitivne i negativne izraženosti Cx43 između zdrave sluznice debelog crijeva uzorkovane nasuprot adenoma niskog (SLG) i visokog (SHG) stupnja displazije

5.3. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43

5.3.1. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva

Usporedili smo izraženost Cx43 u odnosu na pojedine kliničke i patohistološke odrednice ispitanika, te su učinjene korelacije između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva (tablica 17 - tablica 19).

Tablica 17. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva

		Cx43 u adenomatoznom polipu			
		Nema izraženosti		Pozitivna izraženost	
		N	%	N	%
Tip polipa	Tubularni	14	31,1 %	31	68,9 %
	Vilozni	11	26,2 %	31	73,8 %
Tip polipa	Tubularni	14	31,1 %	31	68,9 %
	Vilozni	5	29,4 %	12	70,6 %
	Tubulovilozni	6	24,0 %	19	76,0 %
Tip polipa	Tip 0- Ip	4	19,0 %	17	81,0 %
	Tip 0-Is	21	31,8 %	45	68,2 %
Lokalizacija	Desni kolon	7	28,0 %	18	72,0 %
	Lijevi kolon	18	29,0 %	44	71,0 %
Detaljna lokalizacija	Cekoascendens	3	17,6 %	14	82,4 %
	Transverzum	4	44,4 %	5	55,6 %
	Desc+sigma	12	25,5 %	35	74,5 %
	Rektum	6	42,9 %	8	57,1 %
Tip kuhinje	Mediterranska	2	33,3 %	4	66,7 %
	Kontinentalna	20	30,3 %	46	69,7 %
	Miješana	3	20,0 %	12	80,0 %
Pušenje	Pušač	15	38,5 %	24	61,5 %
	Nepušač	4	14,8 %	23	85,2 %
	Bivši pušač	6	28,6 %	15	71,4 %
Alkohol	Pije	13	24,5 %	40	75,5 %
	Ne pije	9	31,0 %	20	69,0 %
	U anamnezi	3	60,0 %	2	40,0 %
Hiperlipidemija*	Ne	14	22,6 %	48	77,4 %
	Da	11	44,0 %	14	56,0 %
Salicilati	Ne	18	26,5 %	50	73,5 %
	Da	7	36,8 %	12	63,2 %
Ca kolona u obitelji**	Ne	25	34,7 %	47	65,3 %
	Da	0	0 %	15	100,0 %
Cx43 u sluznici nasuprot adenoma	Pozitivan	29	53,2 %	33	46,8 %
	Negativan	12	48,0 %	13	52,0 %

*p = 0,046

**p = 0,007

Tablica 18. Razlike u pojedinim kliničkim, patohistološkim i endoskopskim kvantitativnim vrijednostima između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva

Cx43 u adenomu		N	Aritmetička sredina	S D	Standardna greška	P
Dob (godine)	Bez izraženosti	25	65,64	10,99	1,34	0,158
	Pozitivna izraženost	62	63,07	12,07	1,17	
BMI (kg/m2)	Bez izraženosti	25	26,72	4,53	0,91	0,883
	Pozitivna izraženost	62	26,55	5,04	0,64	
Veličina adenoma na patološkom preparatu (mm)	Bez izraženosti	25	8,68	4,06	0,81	0,780
	Pozitivna izraženost	62	8,32	5,83	0,74	
Veličina adenoma endoskopski (mm)	Bez izraženosti	25	14,36	8,95	1,79	0,407
	Pozitivna izraženost	62	12,97	6,14	0,78	

Tablica 19. Korelacija pojedinih kvantitativnih varijabli i izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva

Variable		Izraženost Cx43 u adenomu
Dob (godine)	r	-0,134
	P	0,078
	N	87
BMI (kg/m2)	r	0,025
	P	0,817
	N	87
Veličina adenoma na patološkom preparatu (mm)	r	0,115
	P	0,287
	N	87
Veličina adenoma endoskopski (mm)	r	-0,015
	P	0,887
	N	87

Usporedbom izraženosti Cx43 u adenomatoznom polipu i nasuprotnoj sluznici, obzirom na negativnu (manje od 10 % stanica pozitivnih na Cx43) i pozitivnu (10 % i više stanica pozitivnih na Cx43) izraženost Cx43, nije nađena značajna povezanost ($p = 0,658$). Uz adenom pozitivan na Cx43 bile su 33 sluznice pozitivne na Cx43 i 29 sluznica negativnih na Cx43. Uz adenom negativan na Cx43 bilo je 12 sluznica pozitivnih na Cx43 i 13 sluznica negativnih na Cx43.

Adenome smo obzirom na negativnu i pozitivnu izraženost Cx43 usporedili podijeljene u tri standardna histološka tipa, tubularni, tubulovilozni i vilozni. Odnos adenoma s pozitivnom izraženošću Cx43 naprema adenomima s negativnom izraženošću Cx43 u skupini tubularnih adenoma je 31 (68,9 %) naprema 14 (31,1 %), u skupini tubuloviloznih adenoma 12 (70,6 %) naprema 5 (29,4 %), te u skupini viloznih adenoma 19 (76 %) naprema 6 (24 %). Statistički značajne razlike u izraženosti Cx43 u odnosu na histološki tip adenoma nismo našli ($p = 0,818$).

Adenome smo dodatno podijelili u dvije skupine. U prvu smo svrstali tubularne adenome, a u drugu tubulovilozne i vilozne adenome, te ih usporedili da vidimo da li prisustvo viloznog tipa rasta u adenomu općenito utječe na izraženosti Cx43. Razlike izraženosti Cx43 u adenomima u odnosu na prisutnost viloznog tipa rasta u bilo kojem postotku statistički gledano nije bilo ($p = 0,163$). Kod adenoma s isključivo tubularnim tipom rasta, odnos adenoma pozitivnih na Cx43 naprema onih negativnih na Cx43 bio je 14 (31,1 %) naprema 31 (68,9 %). Kod adenoma viloznog tipa rasta, odnos adenoma pozitivnih na Cx43 naprema adenomima negativnim na Cx43, bio je 11 (26,2 %) naprema 31 (73,8 %).

Gledajući izraženost Cx43 u adenomima u odnosu na endoskopsku podjelu prema Pariškoj klasifikaciji (20), kod polipa tipa 0-Ip bilo je 4 (19 %) Cx43 negativnih adenoma i 17 (81 %) Cx43 pozitivnih adenoma. Kod polipa tipa 0-Is bilo je 21 (31,8 %) Cx43 negativnih adenoma i 44 (68,2 %) Cx43 pozitivnih adenoma. Statistički značajne razlike u izraženosti Cx43 između polipa tipa 0-Ip i polipa tipa 0-Is nisu nađene ($p = 0,260$).

Značajne razlike u izraženosti Cx43 u adenomima obzirom na njihovu raspodjelu prema segmentu crijeva u kojem su nađeni nije bilo ($p = 0,293$).

Razlike izraženosti Cx43 u adenomima ovisno o veličini adenoma mjerenoj na patohistološkom preparatu nije bilo ($p = 0,780$). Adenomi pozitivni na Cx43 bili su prosječne veličine 8,32 mm, a Cx43 negativni 8,68 mm.

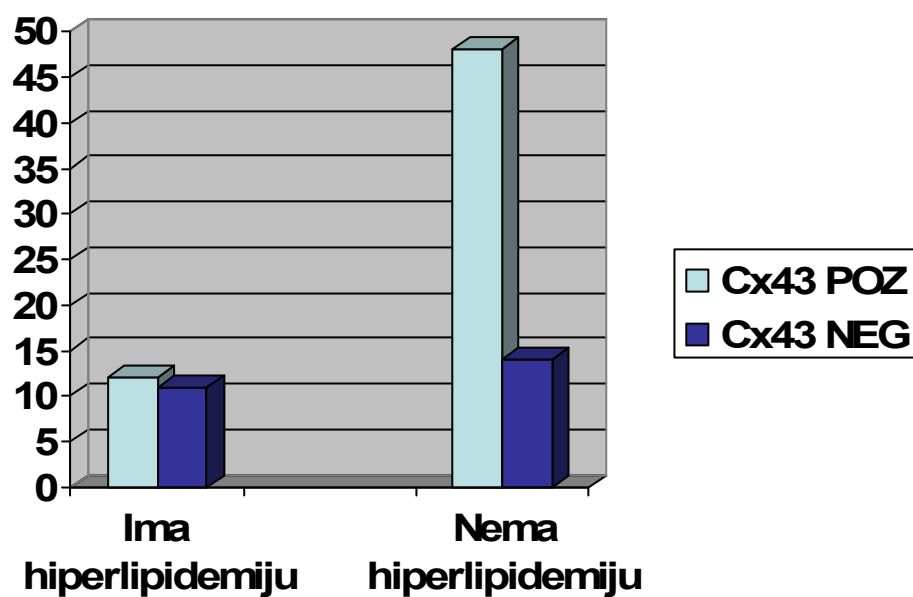
Razlike izraženosti Cx43 u adenomima ovisno o veličini adenoma mjerenoj na endoskopskom preparatu nije bilo ($p = 0,407$). Adenomi pozitivni na Cx43 bili su prosječne veličine 12,97 mm, a Cx43 negativni 14,36 mm.

Korelacije izraženosti Cx43 u adenomatoznim polipima s veličinom adenoma mjerenoj na patohistološkom preparatu ($r = 0,115$, $p = 0,287$)(tablica 19), te mjereno na endoskopskom preparatu ($r = -0,015$, $p = 0,887$), nije bilo (tablica 19).

Usporedbom skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u adenomima, nije nađena statistički značajna razlika u prosječnoj dobi ispitanika. Ispitanici kod kojih je Cx43 u adenomima bio pozitivan imali su prosječnu dob 63,07 godina, dok su oni s negativnim Cx43 u adenomu imali prosječnu dob 65,64 godina ($p = 0,158$). Nije nađena korelacija izraženosti koneksina Cx43 s dobi bolesnika ($r = -0,34$, $p = 0,078$).

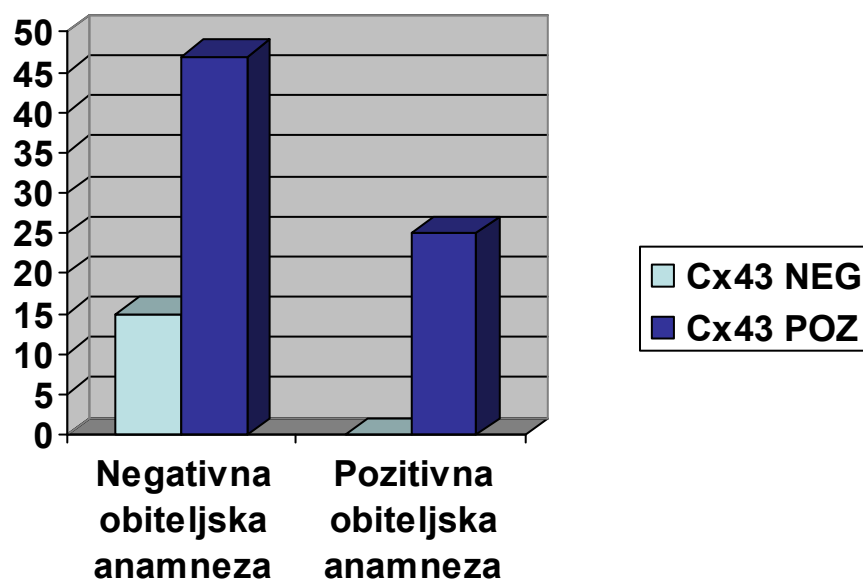
Značajne razlike među skupinama pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u adenomima nije bilo u odnosu na indeks tjelesne mase (BMI). Bolesnici s adenomima pozitivnim na Cx43 imali su prosječni BMI 26,55, dok su oni s negativnim Cx43 imali prosječni BMI 26,72 ($p = 0,883$). Nije nađena korelacija izraženosti Cx43 s indeksom tjelesne mase ($r = 0,025$, $p = 0,817$) (tablica 19).

Kada smo promatrali izraženost Cx43 prema hiperlipoproteinemiji u laboratorijskim nalazima kod ispitanika, vidjeli smo da ispitanici bez hiperlipoproteinemije imaju negativnu izraženost Cx43 u 14 (22,6 %) adenoma, a pozitivnu izraženost u 44 (78,4 %) adenoma, dok ispitanici s hiperlipoproteinemijom imaju negativnu izraženost Cx43 u 11 (44 %) adenoma, a pozitivnu izraženost u 14 (56 %) adenoma. Adenomatozni polipi bolesnika bez hiperlipoproteinemije su češće pozitivni na Cx43 u odnosu na adenomatozne polipe ispitanika bez hiperlipoproteinemije ($p = 0,046$)(slika 20).



Slika 20. Prikaz odnosa Cx43 pozitivnih i Cx43 negativnih adenomatoznih polipa u odnosu na hiperlipoproteinemiju u ispitanika

Bolesnici koji imaju rak debelog crijeva u obitelji prvog i drugog reda, svi (100 %), imaju pozitivnu izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva, dok je 65,3 % ispitanika imalo pozitivnu izraženost Cx43 u adenomima bolesnika s negativnom anamnezom za rak debelog crijeva u užoj obitelji. Ova je razlika i statistički značajna ($p = 0,007$)(slika 21).



Slika 21. Prikaz odnosa Cx43 pozitivnih i Cx43 negativnih adenoma ispitanika u odnosu na pozitivnu anamnezu za rak debelog crijeva u užoj obitelji

Pušenje ($p = 0,113$) i konzumacija alkohola ($p = 0,232$) nisu imali statistički značajan utjecaj na izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva, kao niti tip prehrane ($p = 0,705$).

5.3.2. Razlike u pojedinim kliničkim i patohistološkim odrednicama ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti koneksina 43 u zdravim sluznicama uzorkovanim nasuprot adenomatoznih polipa debelog crijeva

Usporedili smo pojedine kliničke i patohistološke odrednice skupine negativne i pozitivne izraženosti Cx43 u zdravim sluznicama okoline adenoma, kako bi vidjeli da li postoji statistički značajna razlika među skupinama. Rezultati su prikazani u tablici 20 i tablici 21.

Tablica 20. Razlike u pojedinim kliničkim odrednicama između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u sluznici

		Cx43 u sluznici nasuprot adenomatoznog polipa			
		Pozitivna izraženost		Nema izraženosti	
		N	%	N	%
Tip polipa*	Tubularni	20	40,8 %	29	59,2 %
	Vilozni	25	65,8 %	13	34,2 %
Tip polipa**	Tubularni	18	40,0 %	27	60,0 %
	Vilozni	11	64,7 %	6	35,3 %
	Tubulovilozni	16	64,0 %	9	36,0 %
Tip polipa	Tip 0-Ip	14	66,7 %	7	33,3 %
	Tip 0-Is	31	47,0 %	35	53,0 %
Lokacija	Desni kolon	12	48,0 %	13	52,0 %
	Lijevi kolon	33	53,2 %	32	46,8 %
Detaljna lokacija	Cekoascendens	9	52,9 %	8	47,1 %
	Transverzum	3	33,3 %	6	66,7 %
	Desc.+sigma	24	53,3 %	23	46,7 %
	Rektum	9	64,3 %	5	36,7 %
Tip kuhinje	Mediterranska	1	16,7 %	5	83,3 %
	Kontinentalna	35	53,0 %	31	47,0 %
	Miješana	9	60,0 %	6	40,0 %
Pušenje***	Nepušač	17	63,0 %	10	37,0 %
	Pušač	12	57,1 %	9	42,9 %
	Bivši pušač	16	41,0 %	23	59,0 %
Konzumacija alkohola	Ne	30	56,6 %	23	43,4 %
	Da	12	41,4 %	17	58,6 %
	U anamnezi	3	60,0 %	2	40,0 %
Hiperlipidemija	Ne	33	53,2 %	29	46,8 %
	Da	12	48,0 %	13	52,0 %
Salicilati	Ne	34	50,0 %	34	50,0 %
	Da	11	57,9 %	8	42,1 %
Ca kolona u obitelji	Ne	36	50,0 %	36	50,0 %
	Da	9	66,7 %	6	33,3 %
Laksativi u terapiji	Ne	32	50,8 %	31	49,2 %
	Da	13	54,2 %	11	45,8 %
Spol	Ženski	10	47,6 %	11	52,4 %
	Muški	35	53,0 %	31	47,0 %

*p = 0,023

**p = 0,076

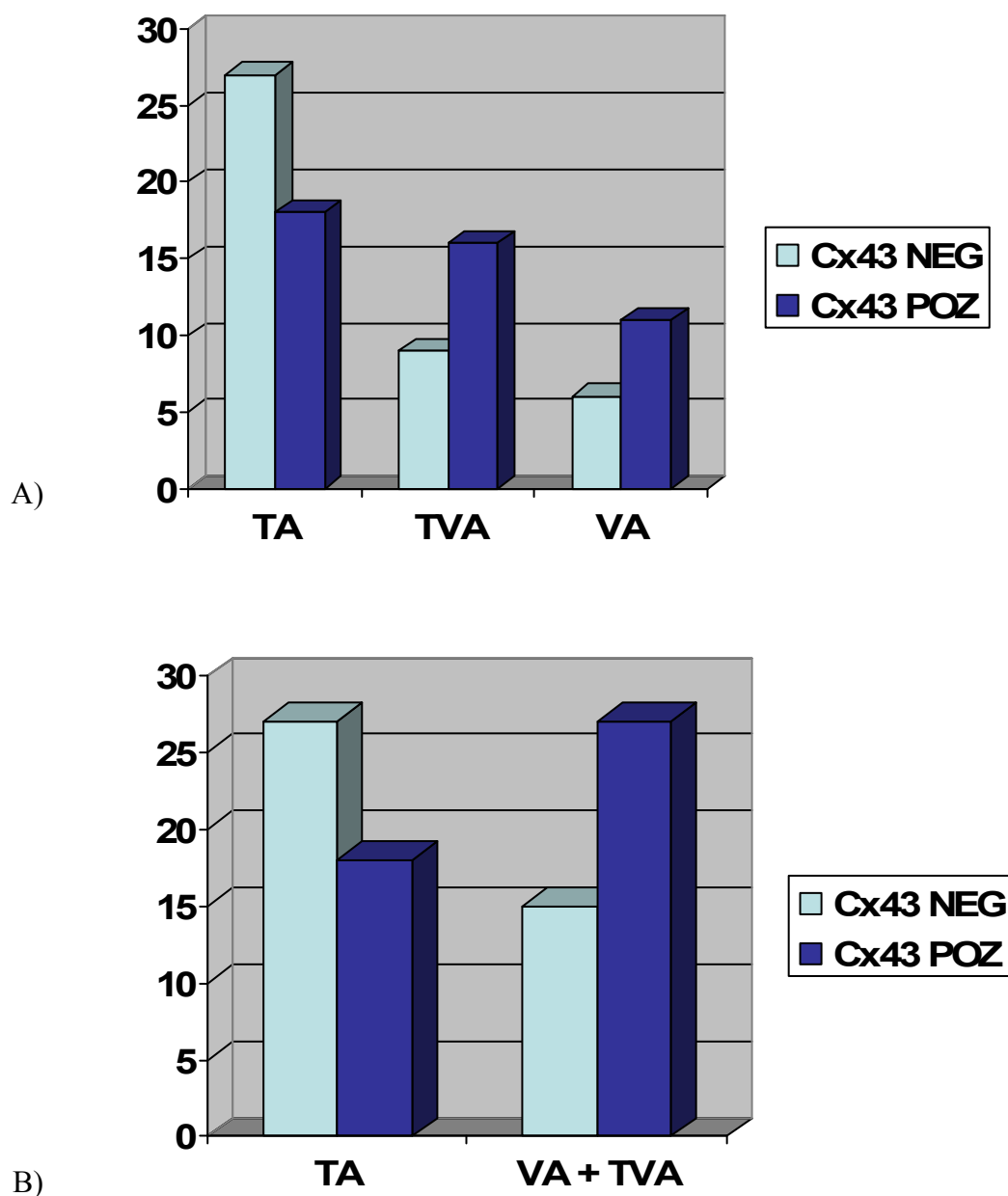
***p = 0,071

Tablica 21. Razlike u pojedinim kliničkim, patohistološkim i endoskopskim kvantitativnim vrijednostima između ispitivanih skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u sluznici uzorkovanoj nasuprot adenomatoznih polipa

Cx43 u sluznici nasuprot adenoma		N	Aritmetička sredina	SD	P
Dob (godine)	Bez izraženosti	42	63,69	11,92	0,925
	Pozitivna izraženost	45	64,40	11,69	
BMI (kg/m ²)	Bez izraženosti	42	26,07	4,29	0,597
	Pozitivna izraženost	45	27,09	5,35	
Veličina adenoma na patološkom preparatu (mm)	Bez izraženosti	42	7,26	3,72	0,069
	Pozitivna izraženost	45	9,51	6,38	
Veličina adenoma endoskopski (mm)	Bez izraženosti	42	11,69	5,73	0,013
	Pozitivna izraženost	45	14,93	7,80	

Kada smo promatrali pozitivnu i negativnu izraženost Cx43 u zdravoj sluznici uzorkovanoj nasuprot adenoma u odnosu na tri standardna histološka tipa, tubularni, tubulovilozni i vilozni, dobili smo da je Cx43 češće pozitivan u okolini viloznog i tubuloviloznog adenoma, a češće negativan u okolini tubularnog adenoma. Razlika je statistički na granici značajnosti ($p = 0,076$)(slika 22 A). Odnos sluznica u okolini adenoma s pozitivnom izraženošću Cx43 naprema sluznicama s negativnom izraženošću Cx43 nasuprot tubularnih adenoma je 18 (40 %) naprema 27 (60 %), nasuprot tubuloviloznih adenoma 16 (64 %) naprema 9 (36 %), i nasuprot viloznih adenoma 11 (64,7 %) naprema 6 (35,3 %).

Sluznice smo dodatno podijelili u dvije skupine. U prvu smo svrstali sluznice uzorkovane nasuprot tubularnih adenoma, a u drugu sluznice uzorkovane nasuprot tubuloviloznih i viloznih adenoma. Htjeli smo pokazati da li prisustvo viloznog tipa rasta općenito utječe na izraženosti Cx43. Kod ovakve podjele očito je da je zdrava sluznica nasuprot adenoma viloznog tipa rasta češće pozitivna na Cx43 (65,8 %) u odnosu na sluznicu nasuprot adenoma tubularnog tipa rasta (40,8 %), što je i statistički gledano bilo značajno ($p = 0,021$)(slika 22 B). Odnos sluznica pozitivnih na Cx43 prema sluznicama negativnim na Cx43 nasuprot tubularnih adenoma bio je 20 (40,8 %) naprema 29 (59,2 %), a u okolini viloznih i tubuloviloznih adenoma 25 (65,8 %) naprema 13 (34,2 %).



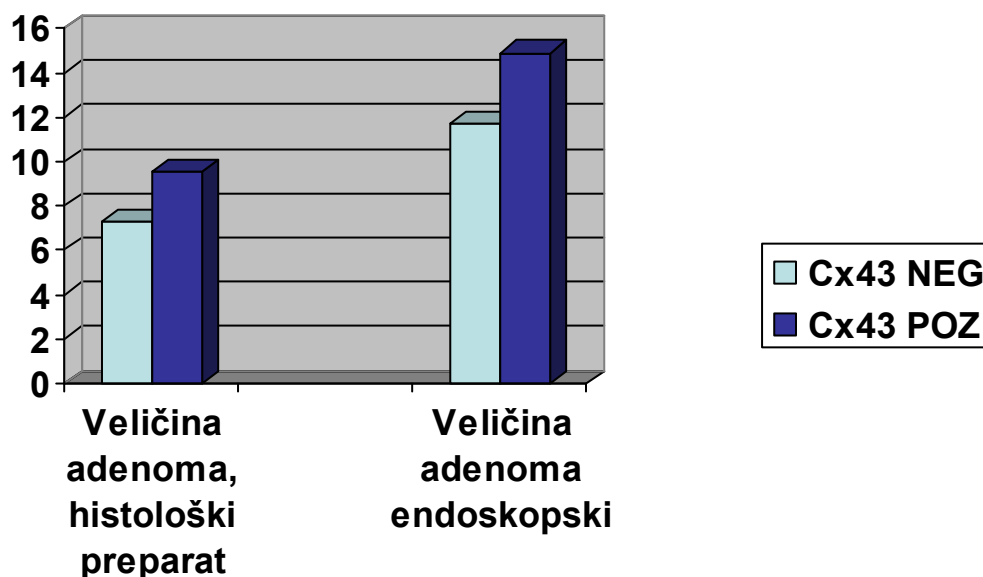
Slika 22. Prikaz odnosa Cx43 pozitivnih i Cx43 negativnih sluznica prema histološkom tipu rasta adenoma nasuprot kojeg su uzorkovane

(A) Odnos izraženosti Cx43 u sluznici naprema podjeli nasuprotnih adenoma na tri uobičajena histološka tipa rasta, (B) Odnos izraženosti Cx43 u sluznici naprema podjeli nasuprotnih adenoma na tubularni tip rasta, te tubulovilozni i vilozni tip rasta (TA-tubularni adenom, TVA - tubulovilozni adenom, VA - vilozni adenom).

Usporedbom izraženosti Cx43 u sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma tipa 0-Is naprema izraženosti u sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma tipa 0-Ip, razlike nije bilo ($p = 0,115$). Među sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma tipa 0-Ip bilo je 14 (66,7 %) sluznica pozitivnih na Cx43 i 7 (33,3 %) sluznica negativnih na Cx43, dok je među sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma tipa 0-Is bilo 31 (47 %) sluznica pozitivnih na Cx43 i 35 (53 %) sluznica negativnih na Cx43.

Značajne razlike u izraženosti Cx43 u zdravoj sluznici uzorkovanoj nasuprot adenoma, obzirom na raspodjelu adenoma prema segmentu crijeva u kojem su nađeni, nije bilo ($p = 0,547$).

Izraženosti Cx43 u zdravim sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma češće su bile pozitivne kod većih adenoma mjereno na endoskopskom preparatu ($p = 0,013$)(slika 23), a isto tako i kod većih adenoma mjereno na patohistološkom preparatu, što je ovdje na granici statističke značajnosti ($p = 0,069$)(slika 23). Prosječna veličina adenoma koji nasuprot ima Cx43 pozitivnu zdravu sluznicu je endoskopski mjereno 14,93 mm, a mjereno na patohistološkom preparatu 9,51 mm. Prosječna veličina adenoma koji u okolini ima Cx43 negativnu zdravu sluznicu je endoskopski mjereno 11,69 mm, a mjereno na patohistološkom preparatu 7,26 mm.



Slika 23. Pozitivna i negativna izraženost Cx43 u zdravoj sluznici nasuprot adenoma u odnosu prema veličini adenoma mjereno endoskopski i na patohistološkom preparatu

Usporedbom skupina pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u sluznicama, nije nađena statistički značajna razlika u prosječnoj dobi ispitanika. Ispitanici kod kojih je Cx43 u sluznicama bio pozitivan imali su prosječnu dob 64,4 godine, dok su oni s negativnim Cx43 u sluznici imali prosječnu dob 63,69 godina ($p = 0,925$).

Značajne razlike među skupinama pozitivne i negativne izraženosti Cx43 u zdravim sluznicama uzorkovanim nasuprot adenoma nije bilo u odnosu na BMI. Bolesnici sa sluznicama pozitivnim na Cx43 imali su prosječni BMI 27,09, dok su oni sa sluznicama negativnim na Cx43 imali prosječni BMI 26,07 ($p = 0,597$).

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici okoline adenoma nije ovisila o prisutnosti hiperlipoproteinemije ($p = 0,658$) u ispitanika, kao niti o uzimanju salicilata ($p = 0,542$) i laksativa ($p = 0,778$) u terapiji.

Nije nađena povezanost izraženosti Cx43 u sluznici i pozitivne obiteljske anamneze za rak debeloga crijeva u srodnika u prvom i drugom koljenu ($p = 0,480$), te anamnestičkog podatka o konzumaciji alkohola ($p = 0,385$).

Bolesnici koji su uzimali salicilate u kroničnoj terapiji, imali su pozitivnu izraženost Cx43 u 73,5 % adenoma, a oni koji nisu uzimali salicilate u terapiji imali su pozitivnu izraženost Cx43 u 63,2 % adenoma. Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva nije bila povezana s uzimanjem salicilata u terapiji ($p = 0,542$).

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici bila je češće negativna kod bolesnika koji nisu pušači, niti su ikada pušili, a statistički gledano ta je veza na granici značajnosti ($p = 0,072$)(slika 24). Kod bolesnika koji nikada nisu pušili 23 sluznice (59 %) su bile negativne na Cx43, a 16 sluznica (41 %) pozitivnih na Cx43. Kod bolesnika koji su bili pušači ili bivši pušači, 19 sluznica (39,6 %) je bilo negativnih na Cx43, a 29 sluznica (50,4 %) pozitivnih na Cx43.

6. RASPRAVA

Izraženost koneksina 43 (Cx43) u sluznici debeloga crijeva primjenom imunohistokemijskih metoda prvi su detaljno opisali Dubina i sur. (143). Našli su da je Cx43 smješten primarno između apikalnih dijelova epitelnih stanica pokrovnog epitela i epitela kripti, u manjem postotku u srednjem dijelu stanice, a rijetko na luminalnim stranama epitelnih stanica. Imunohistokemijska reakcija na Cx43 je pritom bila fino zrnata. Han i sur. (150) su primijetili sličan obrazac reakcije na Cx43, ali su primjetili izraženost Cx43 u samo manjem broju epitelnih stanica zdrave sluznice debeloga crijeva. Kanczuga-Koda i sur. (142) su zamijetili iznimno i intracitoplazmatsku prisutnost Cx43, iako su zaključili da to nije uobičajen obrazac reakcije.

U našem istraživanju obrazac imunohistokemijske reakcije na Cx43 bio je identičan onom opisanom u prethodnim istraživanjima. Membranska reakcija u epitelnim stanicama pokrovnog epitela i epitela kripti sluznice debeloga crijeva bila je fino zrnata, smještena primarno u apikalnom dijelu među epitelnim stanicama, zatim među stanicama u njihovom srednjem dijelu, a rijetko je reakcija bila izražena na luminalnoj strani epitelnih stanica.

U našem istraživanju nismo potvrdili citoplazmatsku lokalizaciju reakcije na Cx43 u stanicama epitela zdrave sluznice debeloga crijeva. Obzirom na kratko poluvrijeme života Cx43, te da je njegova sinteza i izmjena u membranama stanica vrlo intenzivan proces (102), ponekad se može primjetiti njegova aberantna lokacija i u zdravim stanicama (78), čime bi se najvjerojatnije mogla objasniti pojava Cx43 u citoplazmi pojedinih epitelnih stanica zdrave sluznice u ranijim istraživanjima.

Pritom više intrigira različitost izraženosti Cx43 u epitelnim stanicama u zdravoj sluznici, ne u smislu obrasca reakcije u stanici, već postotka imunoreaktivnih stanica, dakle onih pozitivnih na Cx43. U našem istraživanju, kao i kod Hana i sur. (150), izraženost Cx43 je bila niža nego u radovima Kanczuga-Kodae i sur. (142), a poslije i Sirnesa i sur. (166). Jedan dio razlika može se objasniti sličnim, ali ne istim metodama bojanja, kao i korištenjem različitih protutijela.

Ono što je osobito važno, u našem smo istraživanju dokazali da je postotak epitelnih stanica sluznice debeloga crijeva pozitivnih na Cx43 ovisio o mjestu s kojega je sluznica uzorkovana. Stanice sluznice debeloga crijeva su pokazivale izraženost Cx43 u višem postotku kada su bile nasuprot adenoma visokog stupnja displazije (65,9 %), u odnosu na one nasuprot adenoma niskog stupnja displazije (37,2 %)($p = 0,019$).

Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici ovisila je o histološkom tipu adenoma, te o

njegovoj veličini. Izraženost Cx43 bila je viša u stanicama sluznice nasuprot viloznih i tubuloviloznih adenoma u odnosu na tubularne adenome ($p = 0,021$), te u okolini endoskopski mjereno većih adenoma ($p = 0,013$), dok je odnos prema veličini polipa na patohistološkom preparatu težio statistički značajnoj razlici ($p = 0,069$). Koliko je nama poznato, do sada nitko nije proučavao izraženost Cx43 u zdravoj sluznici debeloga crijeva u okolini adenomatoznih polipa debeloga crijeva. Svi dosadašnji radovi bili su usmjereni na ulogu koneksina u pretvorbi adenoma u karcinom i progresiji karcinoma.

Iako se radi o relativno malom uzorku ispitanika, ovi podatci su značajni osobito s gledišta postpolipektomijskog praćenja bolesnika. Na osnovu našeg istraživanja možemo zaključiti da bi izostanak izraženosti Cx43 u sluznici nasuprot adenoma mogao biti dodatni, povoljan prognostički čimbenik za bolesnika s adenomatoznim polipom. Pojava da izraženost Cx43 u stanicama i tkivima ovisi o prisustvu neoplastičnih promjena u okolini nije nova. Povišenu izraženost Cx43 našli su Husoj i sur. (171) u stromi u okolini adenoma debeloga crijeva miša, i to u blizini stanica koje su imale pozitivnu izraženost b-katenina, te Aronica i sur. (173) u astrocitima u blizini tumora mozga. U ovim radovima je to tumačeno intenziviranjem komunikacije između tumora i strome, što bi moglo pomoći širenju (metastaziranju) tumora, ali imati i druge učinke, poput stvaranja preduvjeta za nastanak epileptičkih napadaja u bolesnika s tumorom mozga. Ova pojava bi mogla objasniti različitosti izraženosti Cx43 u epitelnim stanicama zdrave sluznice debeloga crijeva u našem i ranijim radovima, pošto su do sada korišteni patohistološki preparati resekiranih adenokarcinoma debeloga crijeva, od kojih je za imunohistokemijsko bojanje uzeta izgledom zdrava sluznica s ruba preparata. Mogući nedostatak našeg istraživanja su relativno mali preparati zdrave sluznice uzorkovani bioptičkim kliještima tijekom endoskopije, što bi moglo utjecati na konačni rezultat imunohistokemijskog bojanja.

Kanczuga-Koda i sur. (114) su detaljno opisali izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva tubularnog tipa rasta, niskog stupnja displazije. Vilozni tip rasta i adenomi visokog stupnja displazije nisu analizirani. Han i sur. (150) su kasnije sličan obrazac bojanja pokazali na adenomatoznim promjenama visokog stupnja displazije na rubu adenokarcinoma crijeva. Prema rezultatima Kanczuga-Kodae i sur. (114), Cx43 je u tubularnim adenomima niskog stupnja displazije bio izražen u oko 89 % adenoma, a imunoreaktivnost je u pozitivnim adenomima bila podjednako jaka i slaba. Od adenoma pozitivnih na Cx43 svi su imali prisutnu membransku lokalizaciju, a 51 % adenoma je imalo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na Cx43 i u citoplazmi.

Koliko je nama poznato, mi smo u našem istraživanju prvi pokazali izraženost Cx43 u

adenomatoznim polipima niskog i visokog stupnja displazije, neovisno od histološkog tipa adenoma. Ovo je također prvo ovakvo istraživanje koje se bazira na endoskopski uzorkovanim preparatima adenoma (i sluznica). Obrazac imunohistokemijskog bojanja adenomatoznih polipa je bio vrlo sličan kao u ranijim istraživanjima. U skupini adenoma niskog stupnja displazije bilo je 72,1 % adenoma pozitivnih na Cx43, od čega je 48,4 % imalo membransku lokaciju koneksina, a 51,6 % mješanu, membransku i citoplazmatsku lokaciju Cx43. U skupini adenoma visokog stupnja displazije bilo je 70,5 % adenoma pozitivnih na Cx43, od čega je 45,2 % imalo membransku lokaciju Cx43, a 54,8 % mješanu, membransku i citoplazmatsku lokaciju Cx43. Obrazac membranske reakcije u adenomima je bio isti kao u zdravoj sluznici, dok je citoplazmatska reakcija bila grubo zrnata.

Usporedbom izraženosti Cx43 u adenomima niskog i visokog stupnja displazije nismo dobili značajne razlike u obrascu imunohistokemijskog bojanja na Cx43, kao niti u stupnju izraženosti. Značajne razlike izraženosti Cx43 nisu nađene niti ovisno od histološkog tipa adenoma, njegove veličine, endoskopskog izgleda (tip 0-Is / 0-Ip) ili lokacije po pojedinim segmenatima crijeva, što su potpuno novi podatci.

Tijekom istraživanja nije dokazana povezanost izraženosti Cx43 u adenomima i zdravim sluznicama debelog crijeva s dobi, niti sa spolom bolesnika.

Usporedbom izraženosti Cx43 u zdravoj sluznici i adenomima debelog crijeva, u našem istraživanju je pokazano da je u adenomima bila viša izraženost Cx43 u odnosu na nasuprotu zdravu sluznicu ($p = 0,029$), uz istovremeni „bijeg“ koneksina u citoplazmu. Rezultati našeg istraživanja bili su slični rezultatima koje su dobili su Han i sur. (150), a takvi su rezultati ranije opisani i na drugim tkivima. Haberman i sur. (174) su u hiperplastičnom tkivu prostate pokazali višu izraženost Cx43 u odnosu na zdravo tkivo, a potom pad izraženosti u karcinomu prostate. Sawey i sur. (175) su slične rezultate dobili usporedbom izraženosti Cx43 u koži, papilomima kože i malignim promjenama kože štakora.

Viša izraženost Cx43 u adenomima u odnosu na zdravu sluznicu, te viša izraženost Cx43 u sluznici nasuprot adenoma visokog stupnja displazije u odnosu na izraženost u sluznici nasuprot adenoma niskog stupnja displazije je vrlo intrigantna. Na osnovi našeg i ranijih istraživanja možemo pretpostaviti da Cx43 tijekom procesa kolorektalne karcinogeneze sudjeluje istovremeno u barem dva paralelna procesa : samoj malignoj preobrazbi stanica, kako je ranije pokazano, kao tumor supresor, te u procesu prevencije i popravka oštećenja stanica. Viša izraženost Cx43 u adenomima u odnosu na zdravu sluznicu moguća je posljedica pojačanog metabolizma u displastičnim stanicama (174), ali ne smijemo zaboraviti niti mogućnost aktivacije zaštitnih mehanizama očuvanja normalne

funkcije, rasta i razvoja stanica razmjenom protektivnih ili štetnih signala između bolesne i okolnih, zdravih ili bolesnih, stanica (85). Isto bi moglo objasniti i pojačanu izraženost Cx43 u stanicama zdrave sluznice nasuprot adenoma visokog stupnja displazije u odnosu na izraženost u sluznici nasuprot adenoma niskog stupnja displazije.

Ovakvu dvojaku ulogu koneksina u regulaciji staničnog ciklusa, prvi su nagovjestili Yamasaki i sur. (155), a potom i O' Carroll i sur. (180). Koneksini primarno djeluju intrinzično u regulaciju rasta i razvoja stanice, a sekundarno sudjeluju u zaštiti stanice od vanjskih utjecaja, bilo iz okolnog tkiva, bilo iz vanjskog okoliša. Njihova sekundarna uloga mogla bi se iskoristiti u terapiji malignih bolesti (155). Ovo može biti objašnjenje, ponekad zbunjujućih, razlika u rezultatima istraživanja uloge koneksina u procesu karcinogeneze. Slično su zaključili i Iacobas i sur. (169), kada su primjetili da Cx43 negativni miševi mogu imati poremećaj izraženosti i pro- i protuapoptotičkih gena.

Pomak Cx43 s membrane u citoplazmu stanica u adenomima početak je gubitka funkcionalnih pukotinastih spojišta (80, 161) koji počinje pojavom displazije u stanicama, a dalje se nastavlja progresijom displazije prema adenokarcinomu (114). Posljedica citoplazmatske lokalizacije koneksina je gubitak funkcionalnih veza među stanicama (126,128), a potom vjerojatno i interakcija koneksinskih proteina s drugim staničnim proteinima i utjecaj na stanične glasničke putove (109, 111, 112).

Pokazana promjena izraženosti Cx43 od zdrave sluznice, prema adenomatoznim polipima debelog crijeva u našem, kao i u ranijim istraživanjima, jasno sugerira aktivnu ulogu Cx43 u procesu kolorektalne karcinogeneze. Pitanje koje se pritom uvijek postavlja u ovim istraživanjima je da li je promjena izraženosti koneksina i samim time međustanične komunikacije u procesu karcinogeneze njen uzrok ili posljedica (172).

Izraženost Cx43 je istraživana u brojnim radovima ali je u svega nekoliko radova proučavanje bilo usmjereno na njegovu prognostičku vrijednost u karcinomima (166, 177, 178, 181). Nomura i sur. (179) pokazali su na 153 bolesnika s kolorektalnim karcinomom značajnu povezanost koneksina 26 (Cx26) s histološkim tipom i recidivom tumora. Sirnes i sur. (166) pokazali su da se Cx43 ponaša kao tumor supresor u procesu kolorektalne karcinogeneze, te da je gubitak izraženosti koneksina Cx43 povezan s kraćim preživljenjem u karcinomu debelog crijeva. Do sada nitko nije istraživao moguću povezanost zajedničke izraženosti Cx26 i Cx43 i prognoze kolorektalnog karcinoma. Radova koji bi istraživali prognostičku vrijednost izraženosti Cx43 i malignog potencijala adenomatoznih polipa do sada nije bilo.

Značenje, odnosno utjecaj nasljeđa kao rizičnog čimbenika u nastanku raka debelog

crijeva je neprijeporan i prema dosadašnjim istraživanjima kreće se oko 20 % (1, 8). Do sada nije pokazana uloga Cx43 u nasljednoj sklonosti raku debelog crijeva. Mutacija APC gena nalazi se u 60 do 82 % adenomatoznih polipa i smatra se početnim događajem kolorektalne karcinogeneze (48). Poznato je da je gen za Cx43 meta mutiranog APC gena, te da Wnt signalni put i beta katenin pojačavaju transkripciju Cx43, koji opet ima mogućnost povratne regulacije beta katenina (150, 166, 170, 171). Pretpostavlja se i da koneksini ili njihovi dijelovi ulaze u područje jezgre (111,112), pa postoje hipoteze da koneksini djeluju direktno i na transkripciju proteina (113). Cx43 pritom negativno regulira Wnt signalni put (84, 166).

U našem istraživanju, izraženost Cx43 dokazana je u svim adenomima osoba koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak debelog crijeva među srodnicima prvog i drugog reda, neovisno od endoskopskih i patohistoloških značajki adenoma, te njihove veličine i lokacije. Kod bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom, Cx43 je bio pozitivan u oko dvije trećine adenomatoznih polipa. Ovaj podatak sugerira da postoji utjecaj nasljeđa na izraženost Cx43 i funkciju pukotinastih spojišta u adenomima, moguće neovisan od funkcije APC gena. Obzirom na relativno malen broj ispitanika, te da uz Cx43 nije istraživani APC gen, ovaj bi podatak svakako mogao biti osnova za daljnja istraživanja.

Hiperlipoproteinemija i pretilost, osobito abdominalni tip, faktori su rizika za nastanak karcinoma debelog crijeva (10). U našem istraživanju je pokazano da je odsutnost hiperlipoproteinemije značajno utjecala na povišenje izraženosti Cx43 u adenomima debelog crijeva ($p = 0,046$). Ovaj rezultat uklapa se u teoriju o Cx43 kao tumor supresoru, a sugerira da bi adenomi bolesnika s hiperlipoproteinemijom dugoročno mogli imati lošiju prognozu, odnosno bržu progresiju displastičnih / neoplastičnih promjena.

Indeks tjelesne mase kod naših ispitanika bio je značajno viši u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije u odnosu na skupinu s adenomom niskog stupnja displazije (28,36 naprema 24,79; $p < 0,001$). Podatak je time zanimljiviji kada znamo da nije bilo značajne razlike u prosječnoj dobi bolesnika među skupinama. Korelacije izraženosti a Cx43 i indeksa tjelesne mase bolesnika nije bilo ($r = 0,025$, $p = 0,817$), kao niti razlike indeksa tjelesne mase između ispitanika s adenomom pozitivne ili negativne izraženosti Cx43 ($p = 0,883$). Na osnovu ovih podataka možemo pretpostaviti da je kod bolesnika s višom tjelesnom masom moguća brža progresija displazije u odnosu na bolesnike niže tjelesne mase, a taj učinak prema našim rezultatima nije vezan za funkciju pukotinastih spojišta.

Ramachandran i sur. (146) dokazali su da sastojci dima cigarete smanjuju izraženost Cx43 i razinu međustanične komunikacije. Mi smo u našem istraživanju dobili nižu izraženost Cx43 u zdravih sluznica bolesnika koji su nepušači ili nisu nikada pušili u odnosu

na pušače ili bolesnike s anamnezom pušenja. Statistički gledano razlika teži značajnosti ($p = 0,071$), a razlika bi vjerojatno postala značajnija s većim brojem bolesnika. Nasuprot tome, izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debelog crijeva nije pokazivala povezanost s pušenjem, odnosno anamnestičkom podatku o pušenju.

Utjecaj prehrane na izraženost koneksina dokazan je u ranijim radovima (144,145). U našem istraživanju, bolesnici koji su konzumirali mediteranski tip prehrane imali su u zdravoj sluznici okoline adenoma u značajno nižem postotku prisutnu izraženost Cx43 (16,7 %), naprema onima koji su konzumirali kontinentalni tip prehrane (53,03 %). Mali broj bolesnika koji konzumira mediteranski tip prehrane, obzirom na podneblje u kojem je istraživanje rađeno ($n = 6$), ne dozvoljava ozbiljniju statističku analizu. U svakom slučaju bi ove podatke trebalo provjeriti dodatnim istraživanjima.

Usporedbom patohistoloških, endoskopskih i kliničkih obilježja skupine bolesnika s adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije naprema skupini s adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije, dobiveni rezultati su očekivani, i u osnovi slični dosadašnjim radovima.

Prema literaturi, prosječno je oko 13 - 16 % adenomatoznih polipa veće od 10 mm (34 - 37), dok je nama prosječna veličina adenoma mjerena endoskopski bila 13,37 mm, a mjereno na patohistološkom preparatu, naravno, nešto manja, odnosno 8,43 mm. To je samo po sebi očekivano, obzirom na veliku dozu subjektivnosti prilikom određivanja veličine adenomatoznog polipa tijekom endoskopskog zahvata, ali i samog postupka pripreme materijala polipa za patohistološku analizu. Veličina adenomatoznog polipa se tijekom endoskopije određuje indirektno, usporedbom s veličinom upotrijebljenog alata poznatih dimenzija, najčešće bioptičkih kliješta (22, 202), uz prisutnu znatnu količinu stresa. Pritom su otežavajuće okolnosti za endoskopičara crijevna peristaltika, neadekvatna priprema crijeva za proceduru, te moguća nepovoljna pozicija polipa koja otežava analizu oblika i veličine. Značajan doprinos objektivnosti pritom donosi iskustvo endoskopičara. Patološki preparat nakon resekcije kolabira zbog gubitka krvi, a fiksacija u formalinu dodatno, iako u manjem omjeru, utječe na veličinu adenoma. Patohistološki preparat adenomatoznog polipa je objektivno nešto manji (22), a znamo da mjerenje patološkog preparata nije podložno subjektivnom dojmu. U ovom istraživanju u skupini bolesnika s adenomom visokog stupnja displazije prosječna veličina adenoma mjerena endoskopski bila je 15,9 mm, dok je u skupini bolesnika s adenomom niskog stupnja displazije, prosječna veličina očekivano bila manja, odnosno 10,8 mm. Ranije je jasno pokazana progresija displastičnih promjena s veličinom polipa (15), pa je ova razlika adenomatoznih polipa u veličini ovisna od stupnja displazije,

koja je i statistički značajna ($p < 0,001$), potpuno očekivana. Ovakva, velika prosječna veličina adenoma je dijelom posljedica odabira bolesnika, jer ispitanici s diminutivnim polipima nisu uzimani u studiju.

Gledajući raspodjelu patohistoloških tipova adenoma debelog crijeva među skupinama, u skupini s adenomom visokog stupnja displazije bilo je značajno više viloznih i tubuloviloznih adenoma, u odnosu na skupinu s adenomom niskog stupnja displazije ($p = 0,003$), što je također očekivano (15, 35).

Endoskopska pojavnost adenoma niskog stupnja displazije, prema Pariškoj klasifikaciji (21), češće je tipa 0-Is, a pojavnost adenoma visokog stupnja displazije je češće tipa 0-Ip ($p = 0,002$). Svi adenomi početkom rasta prolaze kroz fazu značajki sesilnog polipa, dakle tipa 0-Is (46), a kako su adenomi niskog stupnja displazije u našem istraživanju i statistički značajno manji, ovaj rezultat se mogao očekivati.

Učestalošću pojavnosti i raspodjelom adenomatoznih polipa po segmentima crijeva, naši rezultati uglavnom prate ranije rezultate (5, 6). Kod naših ispitanika bilo je nešto manje adenoma od očekivanog uzorkovano iz cekoascendensa (19,5 %), a nešto više iz silaznog i sigmoidnog crijeva (54 %), što je najvjerojatnije posljedica nešto većih adenoma od prosjeka, koji se i inače češće nalaze u aboralnom dijelu debelog crijeva (31).

U našem istraživanju potvrdili smo imunohistokemijski, dakle metodom prikaza genskog izražaja na proteinskoj razini, izraženost Cx43 na membranama epitelnih stanica u endoskopski izgledom zdravoj sluznici debelog crijeva, koja je i histološki bila bez značajnih promjena, te u tubularnim adenomima debelog crijeva niskog stupnja displazije. Izraženost Cx43 je prvi put do sada opisana u adenomima debelog crijeva visokog stupnja displazije. Razlika izraženosti Cx43 nađena je između (bolesne) sluznice adenomatoznih polipa i zdrave sluznice debelog crijeva. Osobito je važno da se izraženost koneksina Cx43 razlikuje u zdravoj sluznici debelog crijeva nasuprot adenomatoznog polipa niskog stupnja displazije, prema izraženosti u zdravoj sluznici debelog crijeva nasuprot adenomatoznog polipa visokog stupnja displazije. Temeljem dobivenih rezultata, vidljivo je da Cx43 sudjeluje u procesu nastanka karcinoma debelog crijeva, iako u tom procesu postoji još dosta nejasnoća.

U ranijim radovima je pokazano da se u osnovi malen broj adenoma, čak manje od 5 %, tijekom životnog ciklusa preobrazi u karcinom (177). To upućuje na zaključak da genetski i epigenetski mehanizmi nastanka adenomatoznih polipa debelog crijeva nisu istovjetni mehanizmima daljnje pretvorbe adenoma prema malignom tumoru. Obzirom na incidenciju i mortalitet karcinoma debelog crijeva, za koji je opće prihvaćeno da u 95 % i više slučajeva nastaje iz adenomatoznih polipa, ključno je dakle prepoznati bolesnika s

adenomatoznim polipom, koji dugoročno ima visoki rizik nastanka raka debelog crijeva, ili rizik recidiva adenoma po endoskopskoj resekciji, te takvog bolesnika izdvojiti iz mase bolesnika s adenomima koji taj rizik nemaju ili je on nizak.

Imunohistokemijsko određivanje izraženosti Cx43 u sluznici debelog crijeva nasuprot adenomatoznog polipa, kao relativno jednostavna i jeftina metoda, mogla bi biti dodatni čimbenik u predikciji malignog potencijala adenomatoznih polipa, što je bitno u planiranju liječenja i postpolipektomijskog praćenja bolesnika.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti:

1. Imunohistokemijska izraženost Cx43 u stanicama pokrovnog epitela i epitela kripti adenomatoznih polipa debeloga crijeva visokog stupnja displazije bila je negativna u 29,5 % ispitanika, srednje visoka u 38,6 % ispitanika i visoka u 31,8 % ispitanika. Izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva niskog stupnja displazije bila je negativna u 27,9 % ispitanika, srednje visoka u 53,5 % ispitanika i visoka u 18,6 % ispitanika. Izraženost Cx43 u stanicama pokrovnog epitela i epitela kripti zdrave sluznice nasuprot adenoma, bila je negativna u 48,3 % ispitanika, srednje visoka u 34,5 % ispitanika i visoka u 17,2 % ispitanika. Imunohistokemijska reakcija na Cx43 u epitelnim stanicama u zdravoj sluznici debelog crijeva bila je isključivo membranska, između apikalnih dijelova epitelnih stanica, potom u sredini, a rijetko na luminalnoj strani stanica. Reakcija na Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva bila je membranska, identičnog rasporeda kao u zdravoj sluznici, a u 52 % adenoma nađena je paralelno i citoplazmatska reakcija. Razlika izraženosti Cx43 između sluznice adenoma i nasuprotne zdrave sluznice debelog crijeva je statistički značajna ($p = 0,039$).
2. Razlike izraženosti Cx43 između adenoma niskog stupnja displazije i adenoma visokog stupnja displazije nije bilo ($p = 0,229$). Obzirom na dobivene rezultate izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima nije prognostički čimbenik malignog potencijala adenoma.
3. Nađena je statistički značajna razlika izraženosti Cx43 između zdrave sluznice crijeva uzorkovane nasuprot adenoma niskog stupnja displazije i sluznice crijeva uzorkovane nasuprot adenoma visokog stupnja displazije ($p = 0,029$). Cx43 je češće pozitivan u zdravoj sluznici nasuprot adenoma visokog stupnja displazije u odnosu na sluznicu nasuprot adenoma niskog stupnja displazije (65,9 % naprema 37,2 %). Razlika izraženosti Cx43 postoji i u odnosu prema histološkom tipu i veličini adenoma. Cx43 je češće negativan u zdravoj sluznici nasuprot adenoma tubularnog tipa rasta, u odnosu na sluznicu nasuprot adenoma viloznog tipa rasta (69,1 % naprema 30,9 %, $p = 0,021$). Cx43 je također češće negativan u sluznici nasuprot endoskopski mjereno manjih adenoma (Mann-Whitneyev U test, $p = 0,013$). Ovi rezultati sugeriraju da bi

izostanak izraženosti Cx43 zdravoj sluznici debeloga crijeva nasuprot adenomatoznog polipa mogao biti dodatni, pozitivan prediktivni čimbenik u procjeni malignog potencijala adenomatoznog polipa.

4. Izraženost Cx43, a time i razina međustanične komunikacije propusnim vezama, niža je u adenoma ispitanika koji imaju hiperlipoproteinemiju ($p = 0,046$). Imajući u vidu teoriju o Cx43 kao tumor-supresoru, hiperlipoproteinemija bi, kao rizični čimbenik za rak debeloga crijeva, putem učinka na izraženost Cx43 mogla utjecati na brzinu maligne pretvorbe adenomatoznih polipa.
5. Koneksin Cx43 je pozitivan u svih adenomatoznih polipa ispitanika koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu za karcinom debeloga crijeva, za razliku od onih koji nemaju pozitivnu obiteljsku anamnezu (100% naprema 65,3 %, $p = 0,007$). Ovaj podatak upućuje na moguću ulogu Cx43 i pukotinastih spojišta u nasljednoj sklonosti raku debeloga crijeva.

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da Cx43 ima značajnu ulogu u nastanku adenoma debeloga crijeva, prvog koraka u procesu kolorektalne karcinogeneze. Prognostičku vrijednost Cx43 u adenomatoznim polipima i sluznici debeloga crijeva tek treba u potpunosti odrediti. Za očekivati je da bi Cx43 mogao biti značajan prognostički faktor obzirom na povezanost s Wnt signalnim putem. Određivanjem izraženosti Cx43 u sluznici nasuprot adenomatoznih polipa debeloga crijeva, jednostavnom i relativno jeftinom metodom, moglo bi se kod pojedinih adenomatoznih polipa produljiti vrijeme do kontrolne kolonoskopije i na taj način izbjeći nepotrebne rizike i troškove koje pretraga i priprema za samu pretragu nose. Obzirom na incidenciju adenomatoznih polipa u populaciji, to bi omogućilo veću dostupnost kolonoskopije i kvalitetniju prevenciju raka debeloga crijeva.

8. SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je izraženost koneksina 43 (Cx43) u adenomatoznim polipima visokog i niskog stupnja displazije, te izgledom zdravoj sluznici debeloga crijeva nasuprot adenoma, koja je i patohistološki bez značajnih promjena. Hipoteza istraživanja je bila da je izraženost Cx43 snižena u adenomatoznim polipima debeloga crijeva visokog stupnja displazije u odnosu na adenomatozne polipe niskog stupnja displazije, te u odnosu na morfološki zdravu sluznicu debeloga crijeva.

Na temelju hipoteze, postavljeni su ciljevi istraživanja :

1. Opći cilj: odrediti izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima debeloga crijeva niskog stupnja displazije, adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije, te u morfološki normalnoj sluznici stijenke crijeva nasuprot polipa.

2. Specifični ciljevi:

a) usporediti izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije prema izraženosti u adenomatoznim polipima niskog stupnja displazije, te u odnosu na izraženost u morfološki nepromijenjenoj sluznici crijeva

b) usporediti izraženost Cx43 u sluznici crijeva nasuprot adenoma niskog stupnja displazije, prema onoj nasuprot adenoma visokog stupnja displazije

c) usporediti izraženost Cx43 u odnosu na pojedine kliničke parametre.

Istraživanje je obuhvatilo 87 bolesnika kojima je učinjena endoskopska resekcija adenomatoznog polipa debeloga crijeva. Tom prilikom dodatno je uzeta i biopsija sluznice nasuprot adenoma. Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom, a dodatno su učinjeni rezovi tkiva koji su analizirani imunohistokemijski monoklonalnim protutijelima na Cx43.

Imunohistokemijska izraženost Cx43 potvrđena je u stanicama pokrovnog epitela i epitela kripti adenomatoznih polipa debeloga crijeva niskog stupnja displazije i izgledom zdravoj sluznici debeloga crijeva uzorkovanoj nasuprot adenoma, dok je prvi put opisana izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima visokog stupnja displazije neovisno od histološke građe.

Imunohistokemijska reakcija na Cx43 bila je fino zrnata, smještena membranski u epitelnim stanicama zdrave sluznice i adenoma, a u 52 % adenoma je paralelno bila prisutna grubozrnata citoplazmatska reakcija. U adenomima visokog stupnja displazije izraženost

Cx43 je bila negativna u 29,5 % ispitanika, srednje visoka u 38,6 % i visoka u 31,8 % ispitanika. Izraženost Cx43 u adenomima debelog crijeva niskog stupnja displazije bila je negativna u 27,9 % ispitanika, srednje visoka u 53,5 % i visoka u 18,6 % ispitanika. Izraženost Cx43 u zdravoj sluznici bila je negativna u 48,3 % ispitanika, srednje visoka u 34,5 % i visoka u 17,2 % ispitanika. Među ispitivanim skupinama postoji statistički značajna razlika u izraženosti Cx43 ($p = 0,039$).

Razlike izraženosti Cx43 između adenoma niskog stupnja displazije i adenoma visokog stupnja displazije nije bilo ($p = 0,229$).

Nadena je statistički značajna razlika izraženosti Cx43 između zdrave sluznice crijeva nasuprot adenoma niskog stupnja displazije i sluznice crijeva nasuprot adenoma visokog stupnja displazije ($p = 0,029$). Cx43 je češće pozitivan u zdravoj sluznici nasuprot adenoma visokog stupnja displazije u odnosu na sluznicu nasuprot adenoma niskog stupnja displazije (65,9 % naprema 37,2 %). Nadalje, Cx43 je češće negativan u zdravoj sluznici nasuprot adenoma tubularnog tipa, u odnosu na sluznicu nasuprot adenoma viloznog tipa (69,1 % naprema 30,9 %, $p = 0,021$). Cx43 je češće negativan u sluznici uzorkovanoj nasuprot endoskopski mjereno manjih adenoma (Mann-Whitneyev U test, $p = 0,013$).

Izraženost Cx43, a time i razina međustanične komunikacije propusnim vezama, niža je u adenomima ispitanika koji imaju hiperlipoproteinemiju ($p = 0,046$). Učinkom na izraženost Cx43, prisutnost hiperlipoproteinemije bi mogla utjecati na brzinu maligne pretvorbe adenomatoznih polipa.

Koneksin Cx43 je pozitivan u svih adenomatoznih polipa ispitanika koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu za karcinom debelog crijeva, za razliku od onih koji nemaju pozitivnu obiteljsku anamnezu (100 % naprema 65,3 %, $p = 0,007$), što upućuje na moguću ulogu Cx43 u nasljednoj sklonosti raku debelog crijeva.

Prema našim rezultatima, izraženost Cx43 u adenomatoznim polipima nije prognostički čimbenik malignog potencijala adenoma, dok bi izostanak izraženosti Cx43 u sluznici nasuprot adenomatoznog polipa mogao biti dodatni, pozitivan, prediktivni čimbenik u procjeni malignog potencijala adenomatoznog polipa. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da Cx43 ima značajnu ulogu u nastanku adenoma debelog crijeva, odnosno kolorektalnoj karcinogenezi. Prognostičku vrijednost Cx43 u adenomatoznim polipima i sluznici debelog crijeva tek treba odrediti. Određivanjem izraženosti Cx43 u sluznici nasuprot adenoma debelog crijeva, jednostavnom i relativno jeftinom metodom, moglo bi se kod pojedinih adenoma produljiti vrijeme do kontrolne kolonoskopije i na taj način izbjeći nepotrebne rizike i troškove koje pretraga nosi.

9. SUMMARY

CONNEXIN 43 EXPRESSION PATTERNS IN ADENOMATOUS COLONIC POLYPS

The hypothesis of this study is that expression of connexin 43 (Cx43) is reduced in adenomatous polyps of the colon with a high degree of dysplasia compared to adenomatous polyps with a low grade dysplasia, and in relation to the morphologically normal colonic mucosa.

The participants in this study are 87 patients who underwent polypectomy based on indications in our institution. The research includes pathohistological analysis of collected material as well as immunohistochemical analysis of Cx43 expression in adenomatous polyp tissue and endoscopically normal mucosa surrounding the polyps.

In patients with high grade adenomatous polyps Cx43 expression was found negative in 29,5 %, positive in 38,6 % and highly positive in 31,8 % of patients. In patients with low grade adenomatous polyps expression of Cx43 was found negative in 27,9 %, positive in 53,5 % and highly positive in 18,6 % of patients. In mucosa surrounding polyps Cx43 expression was found negative in 48,3 %, positive in 34,5 % and highly positive in 17,2 % of patients. Statistical analysis showed no significant difference in Cx43 expression between low and high grade dysplastic adenomatous polyps. Significant correlation of Cx43 expression in mucosa surrounding polyps was found with polyp size ($p = 0,013$) and villous histology ($p = 0,021$). Significant correlation of Cx43 expression in adenomatous polyps was found with patients hyperlipidaemia ($p = 0,046$).

To our knowledge, this is the first description of Cx43 expression characteristics in surrounding mucosa of colorectal adenomatous polyps and polyps with high grade dysplasia. Frequent Cx43 expression in observed surrounding mucosa of adenomatous polyps with high grade dysplasia and frequent lack of Cx43 expression in surrounding mucosa of adenomatous polyps with low grade dysplasia suggest there is significant role of Cx43 in the progression of dysplasia in adenomatous polyps as well as in colorectal carcinogenesis.

Lack of Cx43 expression in normal colon mucosa surrounding polyps may be positive predictive factor for adenomatous polyps prognosis.

Alen Bišćanin, Zagreb, 2014.

10. LITERATURA

1. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, ur. Cancer incidence in five continents. 9. izd. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007, str. 269-382.
2. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Continuing declines in cancer mortality in the European Union. *Ann Oncol* 2007;18:593-5.
3. Katičić M, Antoljak N, Kujundžić M, i sur. Results of National Colorectal Cancer Screening Program in Croatia (2007-2011). *World J Gastroenterol* 2012;18:4300-7.
4. Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ* 1998;317:559-65.
5. Pendergrass CJ, Edelstein DL, Hyland LM, i sur. Occurrence of colorectal adenomas in younger adults: an epidemiologic necropsy study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1011-5.
6. Shinya H, Wolff WI : Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 1979;190:679-83.
7. Young GP. Fecal Immunochemical Tests (FIT) vs Office-Based Guaiac Fecal Occult Blood Test (FOBT). *Practical Gastroenterology* 2004;28:46-56.
8. Burt RW. Hereditary aspect of colorectal adenomas. *Cancer* 1992;70 Suppl 5:1296-9.
9. Lieberman DA, Prindiville S, Weiss DG, i sur. Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA* 2003;290:2959-67.
10. Peipins LA, Sandler RS. Epidemiology of colorectal adenomas. *Epidemiol Rev* 1994;16:273-97.
11. Bodmer WPF, Bailey CJ, Bodmer J, i sur. Localisation of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614-23.
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
13. Hamilton SR, Rubio CA, Vogelstein V, i sur. Carcinoma of the colon and rectum. U: Sobin LH, Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise N.D, ur. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Geneva: WHO Press; 2010, str. 104-19.
14. Koniski F, Morson BCJ. Pathology of colorectal adenomas: A colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982;35:830-8.

15. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975;36:2251-70.
16. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, i sur. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990;98:371-9.
17. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas: a distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-37.
18. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* 2008;37:25-46.
19. Huang CS, O'Brien MJ, Yang S, i sur. Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2242-55.
20. Itzkowitz SH, Potack J. Colonic Polyps and Polyposis Syndromes. U: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, ur. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, str. 2155-76.
21. Participants in the Paris Workshop November 30 to December 1, 2002. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon. *Gastroint endosc* 2003;58:6.
22. Schoen RE, Gerber LD, Margulies C. The pathologic measurement of polyp size is preferable to the endoscopic estimate. *Gastrointest Endosc* 1997;46:492-6.
23. Saitoh Y, Waxman I, West AB, i sur. Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in a North American population. *Gastroenterology* 2001;120:1657.
24. Rembacken BJ, Fujii T, Cairns A, I sur. Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *Lancet* 2000;355:1211-4.
25. Owen DA. Flat adenoma, flat carcinoma, and de novo carcinoma of the colon. *Cancer* 1996;77:3-6.
26. Williams AR, Balasooriya BAW, Day DW. Polyps and cancer of the large bowel: a necropsy study in Liverpool. *Gut* 1982;23:835-42.
27. Ryan ME, Parent K, Wyinent LB, i sur. Significance of diminutive colorectal polyps (DCP) in 3281 flexible sigmoidoscopic (FS) examinations. *Gastrointest Endosc* 1985;31:149-56.
28. Weston AP, Campbell DR. Diminutive colonic polyps: Histopathology. spatial distribution, concomitant significant lesions, and treatment complications. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:24-8.

29. Spencer RJ, Melton LJ, Ready RL, Ilstrup DM. Treatment of small colorectal polyps: a population-based study of the risk of subsequent carcinoma. *Mayo Clinic Proc* 1984; 59:305-10.
30. Blue MG, Sivak MV Jr, Achkar E, Matzen R, Stahl RR. Hyperplastic polyps seen at sigmoidoscopy are markers for additional adenomas seen at colonoscopy. *Gastroenterology* 1991;100:564-6.
31. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM. Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer* 1979;43:1847-57.
32. Fearon ER, Bommer GT. Molecular biology of colorectal cancer. U: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, ur. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008:1218-31.
33. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, i sur. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1272-83.
34. Lee CK, Shim JJ, Jang JY. Cold snare polypectomy vs. Cold forceps polypectomy using double-biopsy technique for removal of diminutive colorectal polyps: a prospective randomized study. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1593-600.
35. Otchy DP, Ransohoff DF, Wolff BG, i sur. Metachronous colon cancer in persons who have had a large adenomatous polyp. *Am J Gastroenterol* 1996;91:448-56.
36. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, i sur. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;328:901-6.
37. Butterly LF, Chase MP, Pohl H, Fiarman GS. Prevalence of clinically important histology in small adenomas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:343-51.
38. Martínez ME, Baron JA, Lieberman DA, i sur. A pooled analysis of advanced colorectal neoplasia diagnoses after colonoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 2009;136:832-41.
39. Correa P. Epidemiology of polyps and cancer. U: Morson BC, ur. The pathogenesis of colorectal cancer. Philadelphia: WB Saunders; 1978, str. 126.
40. Sanford D, Markowitz MD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2449-60.
41. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, i sur. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554-62.
42. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, i sur. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:4283-8.

43. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, i sur. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:917-23
44. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, i sur. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. Gut 2009;58:90-6.
45. Bertagnoli MM, Warren RS, Niedzwiecki D, i sur. p27Kip1 in stage III colon cancer: implications for outcome following adjuvant chemotherapy in Cancer and Leukemia Group B protocol 89803. Clin Cancer Res 2009;15:2116-22.
46. Morán A, Ortega P, de Juan C, i sur. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. World J Gastrointest Oncol 2010;2:151-8.
47. Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-Suppressor Genes: a Review and Perspective on an Emerging Field.
J Natl Cancer Inst 2000;92:1717-30.
48. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. Surg Clin North Am 2002;82:891-904.
49. Rusan NM, Peifer M. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. J Cell Biol 2008;181:719-26.
50. Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia.
Med Mol Morphol 2007;40:68-81.
51. Watanabe T, Wu T-T, Catalano PJ, i sur. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. N Engl J Med 2001;344:1196-206.
52. Wood LD, Parsons DW, Jones S, i sure. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 2007;318:1108-13.
53. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, i sur. Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. Cancer Res 1998;58:3101-4.
54. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. Br J Cancer 2005;92:434-44.
55. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. World J Gastroenterol 2007;13:3784-91.
56. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. Br J Surg 2002;89:845-60.

57. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934-41.
58. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-74.
59. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 2004;20:199-206.
60. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
61. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008;29:673-680.
62. Ahlquist DA. Aggressive polyps in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Targets for screening. *Gastroenterology* 1995;108:1590-2.
63. Vasen HFA, Nagengast FM, Meera Khan P. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-4.
64. Jeong SY, Shin KH, Shin JH, i sur. Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1069-77.
65. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, i sur. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
66. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, i sur. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005;436:792.
67. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, i sur. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12098-102.
68. Cha YI, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 2007;58:239-52.
69. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007;356:2131-42.
70. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, i sur. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 2006;355:885-95.
71. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6:322-7.

72. Wong R, Cunningham D. Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol* 2008;26:5668-70.
73. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, i sur. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757-65.
74. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, i sur. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
75. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, i sur. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
76. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 1998;3:208-36.
77. Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 1967;33:107-12.
78. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84:381-8.
79. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signalling. *Eur J Biochem* 1996;238:1-27.
80. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, i sur. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:429-33.
81. Reuss B, Hellmann P, Traub O, Butterweck A, Winterhager E. Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev Genet* 1997;21:82-90.
82. Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal* 2006;18:592-600.
83. Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* 2003;10:2045-2058.
84. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:415-24.
85. Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, i sur. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death Differ* 2009;16:524-36.
86. Huang R, Liu YG, Lin Y, i sur. Enhanced apoptosis under low serum conditions in human glioblastoma cells by connexin 43 (Cx43). *Mol Carcinog* 2001;32:128-38.
87. Maeda S, Nakagawa S, Suga M, i sur. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 2009;458:597-602.
88. Lampe PD and Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 2000;384:205-15.

89. Wagner C. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int* 2008;73:547-55.
90. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359-400.
91. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, i sur. Second Messengers. U: Lodish H, Berk A, ur. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: WH Freeman; 2000, str. 436-481.
92. Morley GE, Taffet SM, Delmar M. Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys J* 1996;70:1294-1302.
93. Delmara M, Coombsa W, Sorgenb P, Duffyc HS, Taffet SM. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:268– 75.
94. Thimm J, Mechler A, Lin H, Rhee S, Lal R. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem* 2005;280:10646–54.
95. Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B. ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1208-18.
96. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MV, Saez JC. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8322–27.
97. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Orellana JA, Bennett MV, Saez JC. Possible involvement of different connexin43 domains in plasma membrane permeabilization induced by ischemia-reperfusion. *J Membr Biol* 2007;218:49–63.
98. Homma N, Alvarado JL, Coombs W, i sur. A particle–receptor model for the insulin-induced closure of Connexin43 channels. *Circ Res* 1998;83:27–32.
99. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 2001;15:10–12.
100. Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 2003; 23: 3588–3596.

101. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, i sur. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 2005;16:3100–6.
102. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical Journal* 2006;394:527-43.
103. Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexins 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci* 2001;114:3845-55.
104. Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 2003;10:173-80.
105. Willecke K, Eiberger J, Degen J, i sur. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002;383:725-37.
106. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, i sur. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 2004;83:706-16.
107. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13644-9.
108. Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia* 2007;55:46–56.
109. Krutovskikh V, Mazzoleni G, Mironov N, i sur. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int J Cancer* 1994;56:87-94.
110. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, i sur. Connexin 26 correlates with Bcl-xL and Bax proteins expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:1544-8.
111. Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 2003;278:44852-6.

112. Moorby C, Patel M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation.
Exp Cell Res 2001;271:238-48.
113. Dang X, Doble BW, Kardami E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth.
Mol Cell Biochem. 2003;242:35-8.
114. Kanczuga-Koda L, Koda M, Sulkowski S, Wincewicz A, Zalewski B, Sulkowska M. Gradual Loss of Functional Gap Junction within Progression of Colorectal Cancer – A Shift from Membranous CX32 and CX43 Expression to Cytoplasmic Pattern During Colorectal Carcinogenesis.
In vivo 2010;24:101-8.
115. Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells.
Nature 1966;209:1248-9.
116. Abercrombie M. Contact inhibition and malignancy.
Nature 1979;281:259-62.
117. Suleanov A, Hine C, Azpurua J, i sur. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. U: Klein RG, ur.
Proceedings of the National Academy of Sciences; 2009, str. 19352-57.
118. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death.
Toxicol Pathol 2007;35:495-516.
119. Ferrer I. Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies.
Cerebrovasc Dis 2006;21:9-20.
120. de Pina-Benabou MH, Szostak V, Kyrozis A, i sur. Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia.
Stroke 2005;36:2232-7.
121. Frank DK, Szymkowiak B, Josifovska-Chopra O, Nakashima T, Kinnally KW. Single-cell microinjection of cytochrome c can result in gap junction-mediated apoptotic cell death of bystander cells in head and neck cancer.
Head Neck 2005;27:794-800.
122. Decrock E, De Vuyst E, Vinken M, i sur. Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model.
Cell Death Differ 2009;16:151–163.

123. Elcock FJ, Chipman JK, Roberts RA. The rodent nongenotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin inhibits intercellular communication in rat but not guinea-pig hepatocytes, perturbing S-phase but not apoptosis.
Arch Toxicol 1998;72:439-44.
124. Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells.
Oncogene 2002;21:1989-99.
125. Farahani R, Pina-Benabou MH, Kyrozis A, i sur. Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as “good samaritans” or executioners. Glia 2005;50:351-61.
126. Kalvelyte A, Imbrasaite A, Bukauskiene A, Verselis VK, Bukauskas FF. Connexins and apoptotic transformation. Biochem Pharmacol 2003;66:1661-72.
127. Theiss C, Mazur A, Meller K, Mannherz HG. Changes in gap junction organization and decreased coupling during induced apoptosis in lens epithelial and NIH-3T3 cells.
Exp Cell Res 2007;313:38-52.
128. Hao JL, Suzuki K, Lu Y, i sur. Inhibition of gap junction mediated intercellular communication by TNF-alpha in cultured human corneal fibroblasts.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:1195-200.
129. Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW. A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. J Cell Biol 1997;137:203-10.
130. Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis.
Cell Growth Differ 1998;9:13-21.
131. Nakase T, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes.
Am J Pathol 2004;164:2067-75.
132. Giardina SF, Mikami M, Goubaeva F, Yang J. Connexin 43 confers resistance to hydrogen peroxide-mediated apoptosis.
Biochem Biophys Res Commun 2007;362:747-52.
133. Hutnik CM, Pocrnich CE, Liu H, Laird DW, Shao Q. The protective effect of functional connexin43 channels on a human epithelial cell line exposed to oxidative stress.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:800-6.

134. Albright CD, Kuo J, Jeong S. cAMP enhances Cx43 gap junction formation and function and reverses choline deficiency apoptosis. *Exp Mol Pathol* 2001;71:34-9.
135. Contreras JE, Sánchez HA, Véliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Sáez JC. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;47:290-303.
136. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:552-65.
137. Boehning D, Patterson RL, Snyder SH. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cell Cycle* 2004;3:252-4.
138. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 1992;258:292-5.
139. Rong YP, Aromolaran AS, Bultynck G, i sur. Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol Cell* 2008;31:255-65.
140. Seul KH, Kang KY, Lee KS, Kim SH, Beyer EC. Adenoviral delivery of human connexin37 induces endothelial cell death through apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1144-51.
141. Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, LeCiel C, Huang RP, Boynton AL. Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. *Prostate.* 1999;38:55-9.
142. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sobaniec-Łotowska M, Sulkowska M. Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon - an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42:203-7.
143. Dubina MV, Iatekii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* 2002;21:4992-6.
144. Takahashi H, Nomata K, Mori K, i sur. The preventive effect of green tea on the gap junction intercellular communication in renal epithelial cells treated with a renal carcinogen. *Anticancer Res* 2004;24:3757-62.
145. Tanguy S, Rakotovo A, Jouan MG, Ghezzi C, de Leiris J, Boucher F. Dietary selenium intake influences Cx43 dephosphorylation, TNF- α expression and cardiac remodeling after reperfused infarction. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:522-9.

146. Ramachandran S, Xie LH, John SA, Subramaniam S, Lal R. A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS ONE* 2007;2:712.
147. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, i sur. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 2007;27:13781-92.
148. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, i sur. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 2003;72:408-18.
149. Vaidya D, Tamaddon HS, Lo CW, i sur. Null Mutation of Connexin43 Causes Slow Propagation of Ventricular Activation in the Late Stages of Mouse Embryonic Development. *Circulation Research* 2001;88:1196-202.
150. Han Y, Zhang PJ, Chen T, Yum WS, Pasha T, Furth EE. Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol Res Pract* 2011;10:1155.
151. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228-32.
152. Huang RP, Hossain MZ, Huang R, Gano J, Fan Y, Boynton AL. Connexin 43 (Cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 2001;92:130-8.
153. Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ, Bani-Yaghoub M, Lin ZX, Naus CC. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis* 1998;19:1889-94.
154. Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, i sur. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 2001;61:1765-7.
155. Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *CR Acad Sci III* 1999;322:151-9.
156. Shao Q, Wang H, McLachlan E, Veitch GI, Laird DW. Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* 2005;65:2705-11.

157. Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma.
Am J Obstet Gynecol 2000;182:999-1000.
158. Albright CD, Jones RT, Grimley PM, Resau JH. Intercellular communication in bronchial epithelial cells: review of evidence for a possible role in lung carcinogenesis.
Toxicol Pathol 1990;18:324-41.
159. Tsai H, Werber J, Davia MO, i sur. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells.
Biochem Biophys Res Commun 1996;227:64-9.
160. Huang RP, Hossain MZ, Sehgal A, Boynton AL. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. J Surg Oncol 1999;70:21-4.
161. Plante I, Stewart MKG, Barr K, Allan AL, Laird DW. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease.
Oncogene 2011;30:1681-92.
162. Kapoor P, Saunders MM, Li Z, i sur. Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. Int J Cancer 2004;111:693-7.
163. Ito A, Katoh F, Kataoka TR, i sur. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. J Clin Invest 2000;105:1189-97.
164. el-Sabban ME, Pauli BU. Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. J Cell Biol 1991;115:1375-82.
165. Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD, Spray DC. Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life".
Brain Res Rev 2000;32:308-15.
166. Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, i sur. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome.
Int J Cancer 2012;131:570-81.
167. McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. Cancer Res 2006;66:9886-94.
168. Omori Y, Yamasaki H. Mutated connexin43 proteins inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin43 in a dominant-negative manner.
Int J Cancer 1998;78:446-53.

169. Iacobas DA, Urban-Maldonado M, Iacobas S, Scemes E, Spray DC. Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes.
Physiol Genomics 2003;15:177-90.
170. van der Heyden MAG, Rook MB, Hermans MMP, i sur. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling.
J Cell Sci 1998;111:1741-9.
171. Husøy T, Knutsen HK, Cruciani V, i sur. Connexin43 is overexpressed in ApcMin/+ mice adenomas and colocalises with COX-2 in myofibroblasts.
Int J Cancer 2005;116:351-8.
172. Aasen T, Hodgins MB, Edward M, Graham SV. The relationship between connexins, gap junctions, tissue architecture and tumour invasion, as studied in a novel in vitro model of HPV-16-associated cervical cancer progression.
Oncogene 2003;22:7969-80.
173. Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D. Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex.
Acta Neuropathol 2001;101:449-59.
174. Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.
J Urol 2002;167:655-60.
175. Sawey MJ, Goldschmidt MH, Risek B, Gilula NB, Lo CW. Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia.
Mol Carcinog 1996;17:49-61.
176. El-Sabban ME, Pauli BU. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium.
Invas Metastas 1994;14:164-76.
177. Benko G, Spajić B, Demirović A, Stimac G, Kruslin B, Tomas D. Prognostic value of connexin43 expression in patients with clinically localized prostate cancer.
Prostate Cancer Prostatic Dis 2011;14:90-5.
178. Boban M, Ljubicic N, Nikolic M, i sur. Lack of prognostic significance of connexin-43 labeling in a series of 46 gastrointestinal stromal tumors.
Int J Biol Markers 2011;26:124-8.

179. Nomura S, Maeda K, Noda E, i sur. Clinical significance of the expression of connexin26 in colorectal cancer.
J Exp Clin Cancer Res 2010;29:79.
180. O'Carroll SJ, Alkadhi M, Nicholson LF, Green CR. Connexin 43 mimetic peptides reduce swelling, astrogliosis, and neuronal cell death after spinal cord injury.
Cell Commun Adhes 2008;15:27-42.
181. Conklin CM, Bechberger JF, MacFabe D, Guthrie N, Kurowska EM, Naus CC. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells. Carcinogenesis 2007;28:93-100.
182. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, de Wit M, i sur. Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression. Tumour Biol 2010;31:89-96.
183. Simon JB. Occult blood screening for colorectal carcinoma: a critical review. Gastroenterol 1985;88:820-37.
184. Macrae St F, John DJB. Relationship between patterns of bleeding and Hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. Gastroenterology 1982;82:891-8.
185. Winawer SJ, Schottenfeld D, Flehinger BJ. Colorectal cancer screening. J Natl Cancer Inst 1991;83:243-53.
186. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, i sur. A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. Ann Intern Med 2007;146:244-55.
187. Hundt S, Haug U, Brenner H. Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. Ann Intern Med 2009;150:162-9.
188. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG, i sur. A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. N Engl J Med 2000;342:1766-72.
189. UK Flexible Sigmoidoscopy Screening Trial Investigators. Single flexible sigmoidoscopy screening to prevent colorectal cancer: Baseline findings of a UK multicentre randomized trial. Lancet 2002;359:1291-300.
190. Chu DZJ, Giacco G, Martin RG, i sur. The significance of synchronous carcinoma and polyps in the colon and rectum. Cancer 1986;57:445-50.

191. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, i sur. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings.
N Engl J Med 2000;343:169-74.
192. Williams CB, Macrae FA, Bartrum CI. A prospective study of diagnostic methods in adenoma follow-up. Endoscopy 1982;14:74-8.
193. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, i sur. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology.
Gastroenterology 2008;134:1570-95.
194. Rex DK. Maximizing detection of adenomas and cancers during colonoscopy.
Am J Gastroenterol 2006;101:2866-77.
195. Barclay RL, Vicari JJ, Greenlaw RL. Effect of a time-dependent colonoscopic withdrawal protocol on adenoma detection during screening colonoscopy. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1091-8.
196. Whitlock EP, Lin JS, Liles E, Beil TL, Fu R. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force.
Ann Intern Med. 2008;149:638.
197. Chukmaitov A, Bradley CJ, Dahman B, Siangphoe U, Warren JL, Klabunde CN.
Association of polypectomy techniques, endoscopist volume, and facility type with colonoscopy complications.
Gastrointest Endosc 2013;77:436.
198. Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, i sur. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults.
N Engl J Med 2003;349:2191-200.
199. Mackalski BA, Bernstein CN. New diagnostic imaging tools for inflammatory bowel disease. Gut 2006;55:733-41.
200. Johnson CD, Chen MH, Toledano AY, i sur. Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancers.
N Engl J Med 2008;359:1207-17.
201. Spada C, Hassan C, Marmo R, i sur. Meta-analysis Shows Colon Capsule Endoscopy Is Effective in Detecting Colorectal Polyps.
Clin Gastroenterol Hepatol 2010;8:516-22.

202. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, i sur. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population.
N Engl J Med 2004;351:2704-14.
203. Zou H, Taylor WR, Harrington JJ, i sur. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay.
Gastroenterology 2009;136:459-470.
204. Kozuka S, Nogaki M, Ozeki T, i sur. Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine: II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyps. Dis Colon Rectum 1975;18:494-500.
205. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, i sur. Natural history of untreated colonic polyps.
Gastroenterology 1987;93:1009-13.
206. Bersentes K, Fennerty B, Sampliner RE, i sur. Lack of spontaneous regression of tubular adenomas in two years of follow-up.
Am J Gastroenterol 1997;92:1117-20.
207. Knoernschild HE. Growth rate and malignant potential of colonic polyps: Early results.
Surg Forum 1963;14:137-8.
208. Soehendra N, Binmoeller KF, Seifert S, i sur. Therapeutic Endoscopy, 1 izd. New York: Thieme Verlag; 1998, str.182-97.
209. Choo WK, Subhani J. Complication rates of colonic polypectomy in relation to polyp characteristics and techniques: a district hospital experience.
J Interv Gastroenterol 2012;2:8.
210. Zubarik R, Fleischer DE, Mastropietro C, i sur. Prospective analysis of complications 30 days after outpatient colonoscopy.
Gastrointest Endosc 1999;50:322-8.
211. Stock C, Ihle P, Sieg A, Schubert I, Hoffmeister M, Brenner H. Adverse events requiring hospitalization within 30 days after outpatient screening and nonscreening colonoscopy. Gastrointest Endosc. 2013;77: 419-29.
212. Tanaka S, Oka S, Kaneko I, i sur. Endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasia: possibility of standardization.
Gastrointest Endosc 2007;66:100-7.
213. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello , Johnson DA, Levin T. Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer.
Gastroenterology 2012;143:844-57.

11. KRATKI ŽIVOTOPIS

Rođen sam 16. kolovoza 1972. godine u Ogulinu gdje sam završio osnovnu i srednju školu prirodoslovno-matematičkog smjera.

Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1997. godine.

Tijekom studija obavljao sam dužnost demonstratora na Katedri za fiziologiju i Katedri za patofiziologiju.

Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ završio sam na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2005. godine.

Od 1999. do 2003. godine specijalizirao sam internu medicinu u KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Od 2003. do 2008. godine radio sam kao internist u OB Ogulin.

Od 2008. godine zaposlen sam na Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

U veljači 2011. godine sam položio subspecijalistički ispit iz gastroenterologije i hepatologije.

Tijekom studenog 2012. godine bio sam na usavršavanju iz gastroenterološke endoskopije kod profesora P. Malfertheinera na Sveučilišnoj klinici „Otto-von-Guericke“ u Magdeburgu.

Autor sam i koautor više članaka i kongresnih priopćenja, od čega je 6 radova prihvaćeno za objavljivanje ili objavljeno u časopisima citiranim u Current Contentsu.

Član sam Hrvatskog gastroenterološkog društva.

Oženjen sam i otac dvije kćeri.